

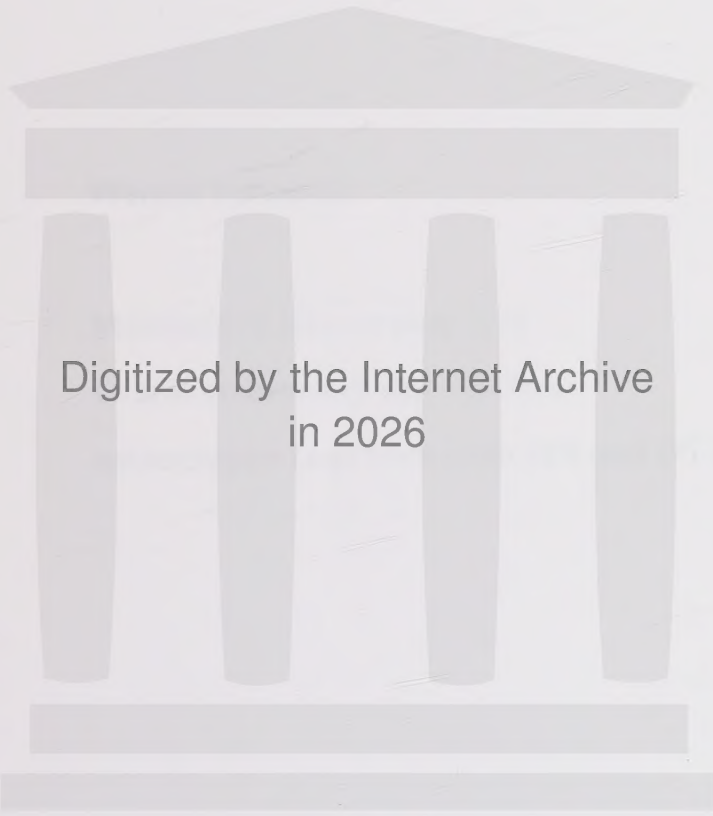
WISSENSCHAFTLICHE FORSCHUNGSBEITRÄGE BIOLOGIE/BIOCHEMIE/CHEMIE

MOLEKULARE KLONIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG DER MURINEN OSTEOTROPEN LEUKÄMIEVIREN RFB UND OS-5

Werner Behnisch

Disbui. München

1988



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Werner Behnisch

**Molekulare Klonierung und
Charakterisierung der murinen
osteotropen Leukämieviren RFB und OS-5**

WISSENSCHAFTLICHE FORSCHUNGSBEITRÄGE: BIOLOGIE/BIOCHEMIE/CHEMIE

BAND 17

WISSENSCHAFTLICHE FORSCHUNGSBEITRÄGE

BIOLOGIE/BIOCHEMIE/CHEMIE

Herausgeber:

Ch. Intemann

A. Intemann

Band 17

CIP-Titelaufnahme der Deutschen Bibliothek

Behnisch, Werner

Molekulare Klonierung und Charakterisierung der murinen
osteotropen Leukämieviren RFB und OS-5 / Werner Behnisch.

- Gauting bei München : Intemann, 1988

(Wissenschaftliche Forschungsbeiträge Biologie, Biochemie, Chemie ;
Bd. 17)

Zugl.: München, Univ., Diss., 1988

ISBN 3-926323-17-5

NE: GT

WG: 32;33

C Copyright 1988 Andreas S. Intemann und Ch. C. Intemann (GbR), Gauting bei München,
Wissenschaftlicher Verlag und technisch-wirtschaftliche Beratung,
8035 Gauting, Luitpoldstr. 10, Tel. (089) 8 50 83 49.

Das Werk einschließlich aller seiner Teile ist urheberrechtlich geschützt. Jede
Verwertung ist ohne Zustimmung des Verlags unzulässig. Das gilt insbesondere
für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung
und Verarbeitung in elektronischen Systemen.

Druck: unikopie München

Molekulare Klonierung und Charakterisierung
der murinen osteotropen Leukämieviren
RFB und OS-5

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt
von
Werner Behnisch
aus
Erding

Januar 1988

1. Berichterstatter
 2. Berichterstatter
- Sondergutachter

Prof. Dr. H. Schmieger
Prof. Dr. H. Cleve
P. D. Dr. V. Erfle

Tag der mündlichen Prüfung: 25. Mai 1988

Meinen Eltern gewidmet

"Natura maxima miranda in minimis". (A. Dohrn)

"Jedes Lebendige ist sein eigener, keiner weiteren Rechtfertigung bedürftiger Zweck und hierin hat der Mensch nichts vor anderen Lebewesen voraus - außer daß er allein auch für sie, das heißt für die Hütung ihres Selbstzwecks, Verantwortung haben kann. Doch die Auszeichnung des Menschen, daß nur er allein Verantwortung haben kann, bedeutet zugleich, daß er sie für andere seinesgleichen auch haben muß". (H. Jonas)

I n h a l t s v e r z e i c h n i s

A:	<u>E I N L E I T U N G</u>	1
B:	<u>M A T E R I A L U N D M E T H O D E N</u>	6
I.	<u>O r g a n i s m e n u n d P l a s m i d e</u>	6
II.	<u>N ä h r m e d i e n u n d P u f f e r</u>	7
III.	<u>Z e l l k u l t u r t e c h n i k e n</u>	
1.	Zellkulturen	9
2.	Kontrolle der Zellkulturen auf Mykoplasmen- infektion	9
3.	Eliminierung von Mykoplasmeninfektion in Zellkulturen	10
4.	Einfrieren von Säugerzellen	10
5.	Nachweis der Virusinfektion durch die indirekte Immunperoxidasefärbung	10
6.	Infektiositätstest von Retroviren	11
7.	Isolierung von Einzelzellklonen	12
8.	Dreifache Endpunktverdünnung eines Virusgemisches	12
9.	Isolierung von retroviralen Partikeln aus Zellkulturüberständen	12
10.	Transfektion von Säugerzellen	13
11.	In vivo Experimente	14
IV.	<u>M o l e k u l a r b i o l o g i s c h e T e c h n i k e n</u>	
1.	<u>Bakterienkulturen</u>	15
2.	<u>Transformation von E. coli Zellen</u>	15



3.	<u>Reinigung und Konzentrierung von DNA</u>	15
3. 1.	Ausschütteln mit Phenol und Ethanol-fällung	15
3. 2.	Reinigung über Ionenaustauschchromatographie	16
3. 3.	Bestimmung der DNA-Konzentration	16
4.	<u>Isolierung von DNA</u>	
4. 1.	Isolierung von supercoiled Plasmid-DNA	17
4. 2.	Schnellpräparation von Plasmid-DNA	18
4. 3.	Isolierung hochmolekularer zellulärer DNA	18
4. 4.	Präparation von Lambda-Phagen DNA	18
4. 5.	Elektroelution von DNA aus Agarosegelen	19
5.	<u>DNA-Analysen</u>	
5. 1.	Restriktionsenzymanalyse	20
5. 2.	Agarose-Gelelektrophorese	20
5. 3.	Nick-Translation	21
5. 4.	Längenstandard-Markierung mit Klenow-Fragment	21
5. 5.	Southern-Blotting	21
5. 6.	Hybridisierung mit ^{32}P -markierter DNA	22
5. 7.	RNase T_1 -Fingerprintanalyse	23
6.	<u>Klonierungsmethoden</u>	
6. 1.	Ligierung mit T4-DNA-Ligase	24
6. 2.	Alkalische Phosphatase-Behandlung von DNA	24
6. 3.	T4-DNA-Polymerase-Behandlung von DNA	24
6. 4.	Klonieren in pUC- und M13-Vektoren	25
6. 5.	<u>Klonieren ecotroper Proviren</u>	
6. 5. 1.	Lokalisierung der Provirusintegrationsorte	25
6. 5. 2.	Isolierung von DNA-Fragmenten aus genomischer DNA	26
6. 5. 3.	Präparation der Vektorarme von λ Phagen- Vektoren	26
6. 5. 4.	Ligasereaktion	27
6. 5. 5.	Verpackung rekombinanter Phagen-DNA	30
6. 5. 6.	Plaque-Lift und Hybridisierung	30

7.	<u>Sequenzanalyse mit der Dideoxymethode nach Sanger</u>	
7. 1.	M13-Sequenzierung	31
7. 1. 1.	Erzeugung von Deletionsmutanten zur Sequenzierung	32
7. 1. 1. 1.	Exonuklease III/S1-Nuklease - Verdau	32
7. 1. 1. 2.	Bal 31 - Verdau	33
7. 2	Plasmid-DNA Sequenzierung	33
8.	<u>Konstruktion der CAT-Plasmide</u>	37
9.	<u>Chloramphenicol-Acetyltransferase-Test (CAT-Assay)</u>	
9. 1.	Herstellung der Zellextrakte	42
9. 2.	Proteinbestimmung	42
9. 3.	Testansatz	43

C: E R G E B N I S S E

1.	<u>Biologische Aktivität osteotroper Retroviren</u>	45
2.	<u>RNase T₁-Fingerprintanalyse von RFB- und OS-5 - RNA</u>	49
3.	<u>Das murine Leukämievirus RFB</u>	57
3. 1.	Molekulare Klonierung des RFB-Provirusgenoms	57
3. 2.	Physikalische Kartierung der klonierten RFB-Provirusgenome	59
3. 3.	Sequenzanalyse der RFB- LTR	65
4.	<u>Das murine Leukämievirus OS-5</u>	72
4. 1.	Molekulare Klonierung des OS-5 - Provirusgenoms	72
4. 2.	Physikalische Kartierung der klonierten OS-5 - Provirusgenome	76
4. 3.	Sequenzanalyse der OS-5 - LTR	78
5.	<u>Biologische Aktivität der RFB- und OS-5-Klone</u>	84

6.	<u>Analyse der Aktivität viraler</u>	
	<u>Transkriptionskontrollelemente im CAT-Assay</u>	89
6. 1	Aktivität der Regulationssequenzen in NIH 3T3 - Zellen	89
6. 2.	Aktivität der Regulationssequenzen in ROS 17/2.8 - und ROS 25/1 - Zellen	90
D:	<u>D I S K U S S I O N</u>	97
E:	<u>Z U S A M M E N F A S S U N G</u>	110
F:	<u>L I T E R A T U R</u>	112

A B K Ü R Z U N G E N

A	Adenin
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
CAP	Chloramphenicol
CAT	Chloramphenicol-Acetyltransferase
D' MEM	Dulbecco Minimal Essential Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FKS	Fötales Kälberserum
G	Guanin
IPF	Immunperoxidasefärbung
kb	Kilobasenpaare
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphate Buffered Saline
RNase	Ribonuklease
T	Thymin

A: E I N L E I T U N G

Das murine Genom besteht bis zu 0.3 % des gesamten genetischen Materials aus endogenen retroviralen Sequenzen (Jaenisch, 1983). Aber auch bei anderen Säugetieren sowie in der menschlichen chromosomalen DNA wurden endogene Retrovirus-verwandte Sequenzen gefunden (Stoye, 1985). Diese Sequenzen werden vertikal über die Keimbahn an die nachfolgenden Generationen vererbt.

Eine ursächliche Beteiligung dieser endogenen Retroviren an der Entstehung von Krankheiten konnte, im Gegensatz zu den exogen vorkommenden Viren, bis heute nicht schlüssig nachgewiesen werden. Vor allem der Pathogenesemechanismus aktivierter endogener, replikationskompetenter Retroviren ist, auch auf Grund einer langen Latenzzeit bis zur Manifestation der Erkrankung, erst in Ansätzen bekannt. Die Onkogenese ist ein sich meist langsam vollziehender, mehrstufiger Prozeß. Replikationskompetente Retroviren bieten ein ausgezeichnetes Modellsystem, die sich über lange Zeiträume erstreckende Tumorentwicklung zu studieren.

Erste Hinweise auf einen Zusammenhang endogener Retroviren mit der Entstehung von Leukämien ergaben sich aus Untersuchungen über verschiedene Inzuchtstämme von Mäusen, die auf eine hohe Frequenz an Leukämien selektiert wurden. Bei der AKR-Maus oder cogenen Stämmen ist eine hohe Spontanrate an Leukämien assoziiert mit den zwei genetischen Loci Akv-1 und Akv-2 (Rowe, 1972; 1973). Diese exprimieren spontan in der frühen Phase der Ontogenese hohe Titer an ecotropen Retroviren, die über die gesamte Lebensspanne persistieren. Durch Rekombination mit anderen endogenen, nicht ecotropen Retroviren entstehen sogenannte MCF-Typen, die charakteristisch sind für Mäuse mit einer hohen

Leukämierate (Rowe, 1980; Evans, 1985). Ob diese Virämie jedoch tatsächlich verantwortlich ist für die Tumorentwicklung, ist unbekannt.

Experimentell kann eine Aktivierung endogener Retroviren durch physikalische oder chemische Agentien bewirkt werden. Beispiele hierfür sind Karzinogene wie halogenierte Pyrimidine oder Hydroxyharnstoff sowie ionisierende Strahlen (Coffin, 1984). So konnten z. B. zwei bis vier Wochen nach Bestrahlung von C57 BL/6 - und Balb/c - Mäusen mit ^{224}Ra aus Milz, Knochenmark und Knochenzellen infektiöse C-Typ Partikel isoliert werden, die sowohl eco- als auch xenotrop waren (Erflle, 1980). Interessanterweise war diese Induktion retroviraler Partikel abhängig von der applizierten Dosis und verlief parallel zur Rate an malignen Tumoren (Schmidt, 1985).

Nach Bestrahlung mit den knochenaffinen Nukliden ^{224}Ra oder ^{90}Sr entwickeln Mäuse zu einem hohen Prozentsatz Osteosarkome (Vaughn, 1973). Die Entstehung dieser Tumoren ist häufig assoziiert mit dem Auftreten von A- und C-Typ Partikeln (Finkel, 1973).

Die Entwicklung dieser strahleninduzierten Osteosarkome steht in engem Zusammenhang mit der Expression retroviraler Antigene und dem Auftreten von Antikörpern während der frühen Latenzzeit (Erflle, 1980). Das Vorkommen neu-integrierter ecotroper Proviren in 60 % der strahleninduzierten Osteosarkome von Balb/c - Mäusen ist ein weiterer Hinweis auf eine Verbindung zwischen der Aktivierung endogener Retroviren und der Tumorentstehung (Strauß, in Druck). Parallel hierzu wurde in allen Tumoren retrovirale RNA exprimiert.

Eine Isolierung und Charakterisierung retroviraler Partikel aus Osteosarkomen wurde als erste von Finkel und Mitarbeitern vorgenommen (Finkel, 1966). Diese Retroviren gliedern sich auf Grund ihrer Onkogenität und ihrer Genomorganisation in zwei Gruppen.

Ein Beispiel für die erste Gruppe ist der FBR-Sarkomvirus-Komplex. Er wurde von Finkel (1975) aus einem ^{90}Sr - induzierten Osteosarkom einer X/Gf - Maus isoliert und besteht aus einem replikationsfähigen, apathogenen Helfer-virus (FBR-MuLV) und einem defekten, Sarkom induzierenden Virus (FBR-MuSV). Im Sarkomvirus sind Teile des viralen Genoms deletiert und enthalten statt dessen zusätzlich das Onkogen v-fos (Curran, 1982).

Dieses Onkogen ist abgeleitet von einem normalen, zellulären Homolog, dem c-fos. Teile dieses zellulären fos-Gens, die keine Intronsequenzen mehr enthalten, sind in modifizierter Form in FBR-MuSV anstelle des pol-Gens und Teilen von gag und env aufgenommen worden (vanBeveren, 1983). Das virale v-fos ist verantwortlich für die transformierenden Eigenschaften der Viren und die Ausprägung des Tumors. Drei bis sechs Wochen nach Injektion in sensitive Mäusestämme entwickeln sich Osteosarkome mit einer Inzidenz von 100 %.

Neben diesen schnell transformierenden Viren, die alle ein Onkogen in ihrem Genom tragen, können auch komplette, replikationsfähige Retroviren ohne Onkogen (s.g. MuLVs) Leukämien und Knochentumoren induzieren (Finkel, 1973). Die Latenzzeit bis zur Manifestation der Erkrankung liegt in dieser zweiten Gruppe von Viren zwischen sechs und fünfzehn Monaten.

Mehrere unterschiedlich stark onkogene, replikationskompetente Viren wurden aus verschiedenen Mäusestämmen isoliert. Aus einem spontanen Osteom einer 101-Maus wurde das OA MuLV isoliert, welches Lymphome und Knochenveränderungen induziert (Schmidt, 1984). Es handelt sich bei OA MuLV um ein N-ecotropes, replikationskompetentes Retrovirus, welches eine große Homologie zu Akv MuLV zeigt. Auch das Akv MuLV induziert, wie neuere Ergebnisse aus Langzeitversuchen in NMRI-Mäusen zeigen, Lymphome und Knochenveränderungen (Luz, pers. Mitteilung).

Ein Virusisolat aus dem Osteosarkom einer C3Hx101/F₁ Hybrid-Maus (OS-2 MuLV) und ein weiteres Isolat (OS-5 MuLV), welches in NMRI Zellen passagiert wurde, induzieren in NMRI-Mäusen ebenfalls T- und B-Zell-Lymphome sowie Osteome (Erfele, 1986). RFB MuLV wurde nach mehreren Passagen aus dem gemischten Extrakt eines FBJ-induzierten Osteosarkoms, eines Lymphosarkoms und eines spontanen Osteoms einer CF-1 Maus isoliert; es ist stark onkogen in NIH/Swiss, CF-1 und CBA Mäusen und gilt als der potenteste virale Induktor benigner Knochentumoren (Finkel, 1973). Die Virusisolate OS-5-, RFB-, OA- und Akv MuLV können somit in eine Gruppe leukämogener, osteotroper Retroviren eingeordnet werden. Sie sind charakterisiert durch eine lange Latenzzeit und ein ähnliches Pathogenitätsspektrum. Sie unterscheiden sich jedoch in ihrer Virulenz und in ihrem onkogenen Potential voneinander.

Die biologischen Eigenschaften der einzelnen Isolate müssen im viralen Genom determiniert sein. Daher könnte ein Vergleich der molekularen Strukturen der verschiedenen Isolate Rückschlüsse auf den Mechanismus der Pathogenese und die Onkogenität der einzelnen Isolate ermöglichen. Die Kenntnisse über den Mechanismus, durch den replikationskompetente murine Leukämieviren ihr onkogenes Potential entfalten, sind bisher erst fragmentarisch, wenn auch bereits in Teilbereichen interessante Ergebnisse gewonnen werden konnten.

Entscheidend für die Onkogenese könnte der Integrationsort in der murinen DNA sein. Bei der sogenannten Insertionsmutagenese findet die Provirusintegration in der Nähe eines zellulären Onkogens statt (Varmus, 1984). Dieses Gen ist nun seiner physiologischen Regulation entbunden und steht unter Kontrolle von Enhancerregionen der LTR des Retrovirus.

Eine verstärkte Bildung von Genprodukten, die Transkription eines Gens in differenzierten Zellen, in welchen es normalerweise nicht exprimiert wird oder die Bildung veränderter Transkripte sind nur einige Möglichkeiten, welche einen ersten Schritt zur Transformation einer Zelle bilden könnten (Varmus, 1984).

Da die Provirusintegration ein statistischer, zufälliger Prozeß ist, muß im Anschluß an die Transformation noch eine Selektion der Tumorzelle stattfinden. Das Auffinden definierter Integrationsorte in Tumoren und deren klonale Entstehung bilden die stärkste Stütze dieser Hypothese (Tsichlis, 1983; Silver, 1986).

Aber auch das virale Genom selbst besitzt Sequenzen, die bei der Onkogenese von Bedeutung sind. Durch Rekombinationsexperimente zwischen nicht defekten Retroviren mit einem unterschiedlichen onkogenen Spektrum konnte eine Hauptdeterminante für das leukämogene Potential in den viralen LTRs lokalisiert werden (Chatis, 1983; 1984). Detaillierte Analysen grenzten diesen Bereich auf die Enhancerelemente in der U3-Region ein. Zur vollen Ausprägung der onkogenen Eigenschaften sind jedoch auch häufig Teile des env-Gens notwendig (DesGroseillers, 1984a).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zwei der osteotropen Retrovirusisolate, OS-5 MuLV und RFB MuLV, in ihrer molekularen Organisation und Feinstruktur näher zu charakterisieren. Der Vergleich der gewonnenen Daten mit denen von OA MuLV und Akv MuLV sollte Hinweise ergeben, welche Abschnitte des viralen Genoms für die spezifischen pathogenen Eigenschaften der einzelnen Isolate verantwortlich sind.

B: M A T E R I A L U N D M E T H O D E N

I. O r g a n i s m e n u n d P l a s m i d e

Das Plasmid pUC CAT1 wurde mir freundlicherweise von M. Lipp, Inst. f. Biochemie, LMU, München überlassen. Alle zur M13 - Sequenzierung notwendigen Bakterienstämme und Viren wurden mir freundlicherweise von F. S. Pedersen, Inst. f. Molekularbiologie, Aarhus, DK, zur Verfügung gestellt.

Die Bakterienstämme LE 392 und JM 83, die Phagen λ Charon 4a und λ gt wes. λ B sowie die Zelllinien NIH 3T3, ROS 17/2.8, ROS 25/1 und die OS-5 -, Akv- und OA MuLV produzierenden Linien stammten aus der Sammlung des Labors Dr. Erfle.

Die mit RFB MuLV infizierte Zelllinie wurde von der American Type Culture Collection (ATTC VR-909) bezogen.

II. Nährmedien und Puffer

Nährmedien

LB-Medium

Trypton 10 g
NaCl 5 g
Hefe-Extrakt 5 g
Wasser ad 1 l
pH 7.4 mit HCl

LB-Agar

LB-Medium 1 l
Agar 11 g

TBM-Platten und TOP-Agar

10 g Trypton

5 g NaCl

ad 1 l Wasser,

mit NaOH pH 7.4 einstellen und 11 g/l Bacto-Agar für
Platten

bzw. 7 g/l Bacto-Agar für

TOP-Agar,

autoklavieren, nach Abkühlen auf 55°C MgSO_4 (10 mM
Endkonz.) zugeben und in Petrischalen verteilen.

Tris-Puffer

T(N)E-Puffer

Tris/HCl, pH 7.4	10 mM
EDTA	1 mM
(NaCl	100 mM)

10 x TGA-Puffer

Tris	96.9 g
Natriumacetat x 3 H ₂ O	54.44 g
EDTA	14.88 g
A. dest.	ad 2 l
pH 8.1 mit Eisessig	

TMG-Puffer

Tris/HCl, pH 7.5	50 mM
MgSO ₄	10 mM
Gelatine	0.01 %

Phosphat-Puffer

PBS (Phosphate Buffered Saline)

NaCl	41.0 g
EDTA	0.25 g
KCl	20.0 g
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	8.6 g
KH ₂ PO ₄	1.5 g
A. bidest.	ad 5 l

III. Zellkulturtechniken

1. Zellkulturen

Die Zellkulturen wurden im Brutschrank bei 37°C und gesättigter Wasserdampfatosphäre mit 5 % CO₂-Anteil gezüchtet. Die Nährlösung war Dulbecco Minimal Essential Medium (D'MEM) mit 2,2 g Bikarbonat, supplementiert mit 20 % fötalem Kälberserum (FKS) bei der Anzucht der Zellen, oder 10 % FKS bei permanenten Kulturen. Bei subkonfluenter Dichte erfolgte eine Passage der Zellen. Die Kulturen wurden dabei 2 x mit PBS gewaschen, mit Trypsinlösung (Trypsin, 0.5 g, EDTA, 0.25 g, PBS ad 1 l) mehrere Minuten bei 37°C inkubiert und die Zellen durch vorsichtiges Anstoßen vom Kulturgefäß gelöst. Die Zellzahl wurde in einem Zellcounter (Coulter Counter R Modell ZM) bestimmt und jeweils 4 x 10³ Zellen/cm² Wachstumsfläche eingesät.

2. Kontrolle der Zellkulturen auf Mykoplasmeninfektion

Zellkulturen wurden in regelmäßigen Abstände von drei Wochen mit der Fluorochrom-Färbemethode nach Chen (1977) auf eine Infektion mit Mykoplasmen kontrolliert. Zellen von subkonfluenter Dichte wurden 1 x mit PBS gewaschen, mit Methanol/Eisessig (3 : 1) fixiert (10 Min.) und unter dem Abzug getrocknet. Die Chromatinmarkierung erfolgte für 10 Min. mit Bisbenzimidlösung (500 ng/ml) in McIlvaine Puffer (Zitronensäure, 0.1 M, Na₂HPO₄, 0.2 M, pH 5.9). Danach wurden die Zellen mit A. bidest gewaschen und an der Luft getrocknet. Der Grad der Kontamination mit Mykoplasmen wurde im Fluoreszenzmikroskop (B4 Erregerfilter, Sperrfilter LP 495; C. Zeiss, Oberkochen) beurteilt.

3. Eliminierung von Mykoplasmeninfektion in Zellkulturen
Kontaminierte Zellkulturen wurden alternierend für je 3 Tage mit den Antibiotika Minocyclin bzw. Tiamutin in einer Endkonzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ behandelt (Schmidt, 1984), bis die Kulturen frei von Mykoplasmen waren.

4. Einfrieren von Säugerzellen

Die Zellen wurden 2 x mit PBS gewaschen, durch Zugabe von Trypsinlösung vom Kulturgefäß gelöst, bei 800 rpm 5 Min. abzentrifugiert und das Zellpellet in einer Lösung aus 70 % Medium, 20 % Serum und 10 % Dimethylsulfoxid resuspendiert. 1 - 2 x 10^6 Zellen wurden in Nunc-Röhrchen kontinuierlich von Raumtemperatur auf -30°C abgekühlt, über Nacht bei -70°C aufbewahrt und am nächsten Tag in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Die Lagerfähigkeit der Zellen beträgt mehrere Jahre.

5. Nachweis der Virusinfektion durch die indirekte Immunperoxidasefärbung

Zum Nachweis einer Virusinfektion in Zellkulturen wurde die Expression des p30 Hüllproteins muriner Leukämieviren durch die indirekte Immunperoxidasefärbung (IPF) nach Nexø (1977) bestimmt.

Die Zellen einer subkonfluenten Kultur wurden mit PBS gewaschen und mit Methanol/Aceton (1 : 1, -20°C) fixiert. Nach 5 Min. wurde die Lösung abgesaugt und unter dem Abzug getrocknet. Auf die fixierten Zellen wurde der gegen das p30 Protein gerichtete Antikörper aus Kaninchen (1 : 500 verdünnt in PBS + 5 % FKS) pipettiert, und anschließend für 60 Min. bei 37°C inkubiert. Zur Entfernung der unspezifisch gebundenen Antikörper wurden die Kulturen 3 x mit PBS gewaschen, 1 x mit PBS für 10 Min. bei 37°C inkubiert und erneut 3 x mit PBS gewaschen. Der zweite, Meerrettich-Peroxidase gekoppelte Antikörper (Ziege anti

Kaninchen IgG) wurde gleichfalls für 60 Min. bei 37 °C (Verdünnung 1 : 1 000 in PBS + 5 % FKS) inkubiert. Das Waschen erfolgte wie oben beschrieben. Als Substrat für das Enzym diente 3-Amino-9-Ethyl- Carbazol. Die vorbereitete Lösung wurde bis zu einer ausreichenden Anfärbung der p30 positiven Zellen (max. 15 Min.) auf den Zellen belassen, durch Waschen unter fließendem Wasser wieder entfernt und die Zellen anschließend mit einer Glycerinlösung bedeckt.

Substrat

20 mg 3-Amino-9-Ethyl-Carbazol
in 5 ml N-N Dimethylformamid auflösen;
+ 95 ml 50 mM Acetatpuffer, pH 5.0
filtrieren und kurz vor Gebrauch
50 µl 30 % Wasserstoffperoxid zugeben.

Acetatpuffer

Natriumacetat, 0.1 M
mit Essigsäure auf pH 5.0 einstellen

6. Infektiositätstest von Retroviren

2×10^5 Zellen wurden in eine 6 cm Ø Petrischale eingesät. Am folgenden Tag wurden 3 ml des zu testenden Zellkulturüberstandes über ein Filter der Porengröße 0.2 µm gereinigt und in 10er Verdünnungsstufen eine Stunde mit der Zellkultur inkubiert. Die Zellen wurden mit Medium gewaschen und 2 Tage im Brutschrank weiter gezüchtet. Durch den Nachweis des viralen p30-Proteins mit der indirekten Immunperoxidasefärbung konnte die Zahl der infizierten Zellen bestimmt werden. Sollte eine möglichst quantitative Infektion aller Zellen erreicht werden, wurde dem Medium für mehrere Tage Polybren (4 µg/ml Enkonz.) zugegeben.

7. Isolierung von Einzelzellklonen

Um Kulturen klonalen Ursprungs zu erhalten, wurden die Zellen in PBS verdünnt, je eine Zelle pro 100 μ l Medium in eine Mikrotiterplatte eingesät und die Vertiefungen nach mehreren Tagen auf Einzelzellklone untersucht. Die Klone wurden bei subkonfluenter Zelldichte passagiert und auf größeren Kulturschalen gezogen.

8. Dreifache Endpunktverdünnung eines Virusgemisches

Um ein Virusgemisch bestehend aus einem Anteil mit hoher Konzentration und einem niedrigtitrigen Begleitvirus voneinander abzutrennen, wird dieses in dreimaliger Folge endpunktverdünnt. Dieses Verfahren ermöglicht, das hochtitrige Virus in reiner Form zu isolieren.

Hierzu wurde der virushaltige Überstand einer Zelllinie in Zehnerschritten verdünnt und in einem Doppelansatz NIH 3T3 - Zellen damit infiziert. Durch Immunperoxidasefärbung wurde diejenige Verdünnung bestimmt, bei der nur eine bis wenige Zellen infiziert wurden. Zellen, die mit dieser Verdünnung infiziert worden waren, wurden so lange in Kultur gehalten, bis im IPF-Test alle Zellen p30 positiv waren. Dieser Versuchsansatz wurde im Anschluß zweimal wiederholt.

9. Isolierung von retroviralen Partikeln aus Zellkulturüberständen

Überstände virusproduzierender Zelllinien wurden zum Abtrennen von Zellen und Zelltrümmern bei 3000 rpm bzw. 8000 rpm für 15 Min. (GS3 Rotor, 4°C) zentrifugiert. Aus den gereinigten Überständen wurden die Viren pelletiert (SW27 Rotor, 25 000 rpm, 90 Min.) und in 200 μ l TNE aufgenommen. Die Reinigung der Viruspartikel erfolgte im Sucrosegradienten. Aus 20 % und 50 % Sucroslösung in TNE-Puffer wurde in einem SW41 Zentrifugenröhrchen ein

linearer Gradient gemischt und mit ca. 2 ml Virussuspension überschichtet. Nach Zentrifugation (30 000 rpm, 16 Std., 4°C) hatten sich die Viruspartikel entsprechend ihrer spezifischen Dichte bei 36 % - 40 % Sucrose konzentriert. Die opaleszierende, virushaltige Bande wurde entnommen, mit TNE 1 : 10 verdünnt, im SW41 Rotor pelletiert (38 000 rpm, 45 Min.) und das Viruspellet in 100 - 200 µl TNE aufgenommen. Aus 1 l Zellkultur-Überstand konnten dadurch 100 - 200 µg virale RNA gewonnen werden.

10. Transfektion von Säugetierzellen

Die Transfektion von Zellen erfolgte im wesentlichen nach der Vorschrift von Gorman (1982). Jeweils $1 - 2 \times 10^6$ Zellen wurden in 10 cm Ø Petrischalen eingesät. Vier Stunden vor Transfektion wurde das Medium gewechselt und die Zellen in 10 ml D'MEM weitergezüchtet. Fünf µg der zu transfizierenden DNA wurden mit TE ad 50 µl Volumen aufgefüllt, mit 500 µl CC-Mix vorsichtig gemischt, diese Lösung kontinuierlich über 30 Sek. zu 550 µl 2 x HBS-Puffer getropft und dabei leicht auf einem Whirl-Mix geschüttelt.

Dieses Lösungsgemisch wurde 15 Min. bei Raumtemperatur belassen und anschließend auf den Zellen verteilt. Nach ca. 30 Min. bildet sich ein fein verteiltes Präzipitat, welches die Zellen bedeckt. Die Zellen wurden vier Stunden inkubiert und anschließend einem Glycerinschock ausgesetzt. Das Medium wurde abpipettiert, 1 ml Glycerinlösung vorsichtig auf der Oberfläche verteilt und für 2 Min. auf den Zellen belassen. Die Glycerinlösung wurde abgesaugt, die Zellen 2 x mit PBS gewaschen, 10 ml Medium mit Penicillin (100 I. U./ml)/ Streptomycin (100 µg/ml) zugegeben und im CO₂- Brutschrank weiterinkubiert.

CC-Mix

0.1 x TE	100 ml
2 M CaCl_2	15 ml
Lachs-Sperma-DNA*	3.75 mg

* ultraschallbehandelt

2 x HBS-Puffer

NaCl	280 mM
Na_2HPO_4	1.5 mM
Hepes	50 mM
pH 7.12, steril- filtriert	

Glyzerinlösung

2 x HBS	50 ml
87 % Glyzerin	30 ml
A. bidest	ad 120 ml

11. In vivo - Experimente

Alle in vivo Versuche wurden an neugeborenen, weiblichen NMRI-Mäusen (GSF, Neuherberg) durchgeführt. Der Überstand einer Virus produzierenden Zelllinie wurde über ein Filter ($0.2 \mu\text{m}$) gereinigt und $100 \mu\text{l}$ des Filtrats ($\text{ca. } 5 \times 10^3$ infektiöse Partikel/ml) subkutan in die Tiere injiziert. Die Mäuse erhielten Futter und Wasser ad libitum. Nach Auftreten von Krankheitssymptomen wurden die Tiere getötet, ihr Skelett geröntgt und Gewebe histologisch untersucht.

IV. Molekularbiologische Techniken

1. Bakterienkulturen

Für eine Übernachtskultur wurden 5 ml LB-Medium mit einem Bakterienstamm angeimpft und bei 37°C geschüttelt. Die Kultur befand sich am nächsten Tag in der stationären Phase. Plasmidhaltige Stämme wurden unter Selektionsbedingungen supplementiert mit 30 - 50 µg Ampicillin/ml gezüchtet.

Für die Kultur in Petrischalen wurden die Bakterien auf LB-Agar zu Einzelkolonien ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Die Aufbewahrung erfolgte in 1 ml 50 % Glyzerin gemischt mit 1 ml einer Übernachtskultur von Bakterien bei -70°C .

2. Transformation von E. coli-Zellen

Die Präparation kompetenter Zellen und die Transformation wurde entsprechend dem Protokoll von Morrison (1979) durchgeführt.

3. Reinigung und Konzentrierung von DNA

3. 1. Ausschütteln mit Phenol und Ethanol-fällung

Die Reinigung der DNA von Proteinresten erfolgte durch Ausschütteln mit Phenol : Chloroform : Isoamylalkohol (50 : 48 : 2). Beide Phasen wurden vorsichtig gemischt, durch Zentrifugation (5 Min., 10 000 rpm) wieder getrennt und der wässrige Überstand abgenommen. Dieser Überstand wurde reextrahiert, bis die Interphase frei von Proteinen vorlag. Abschließend wurde 2 x mit Chloroform : Isoamylalkohol (24 : 1) nachextrahiert und die DNA mit Ethanol gefällt. Diese Methode wird im folgenden kurz als "Phenolisieren" aufgeführt.

Zur DNA-haltigen Lösung wurde 1/20 Volumen 3 M Natriumacetat und mindestens das 2.5 fache Volumen an -20°C kaltem Ethanol gegeben, durchmischt und 15 Min. auf Eis

gestellt. Die DNA wurde durch Zentrifugation (15 Min., 4°C, 10 000 rpm) pelletiert, mit 70 % Ethanol gewaschen und das Pellet getrocknet. Die DNA wurde anschließend in TE-Puffer aufgenommen, aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt.

3. 2. Reinigung von DNA über Ionenaustauschchromatographie

Nach Elektroelution aus Agarosegelen wurde die DNA über eine NACS 52-Prepac-Säule (BRL, Maryland) aufgereinigt und konzentriert. Der Säuleninhalt wurde 3 x mit je 1 ml 2 M NaCl in TE hydriert und mit 0.5 M NaCl in TE äquilibriert. Die DNA-Probe wurde mit 1/10 Volumen 5 M NaCl versetzt und auf die Säule gegeben. Langsame Durchflußgeschwindigkeit und wiederholtes Laden der Säule erhöhte dabei die Effizienz der DNA-Bindung. Die gebundene DNA wurde 3x mit 100 µl 0.5 M NaCl/TE-Puffer eluiert. Die DNA enthaltenden Fraktionen wurden vereint und mit Ethanol gefällt.

3. 3. Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentration der DNA wurde über zwei verschiedene Methoden ermittelt.

- Im Photometer bei 260 nm zeigt die DNA ihr Absorptionsmaximum; 1 OD entsprechen 50 µg DNA/ml.

- Eine Petrischale wurde mit einer dünnen Schicht 1 % Agarose mit 5 µg/ml Ethidiumbromid gefüllt und an der Luft getrocknet. Auf die Oberfläche wurden je 2 µl einer DNA-Standardlösung aufgetropft. Nach dem Trocknen bildeten sich Ringe, deren Intensität unter dem UV-Licht der Menge an aufgetropfter DNA entsprach. Mit einer Probe wurde gleichfalls verfahren und durch Vergleich mit der Standardreihe die Konzentration an DNA ermittelt. Mengen bis zu 500 ng/ml konnten mit dieser schnellen Methode relativ genau nachgewiesen werden.

4. Isolierung von DNA

4. 1. Isolierung von supercoiled-Plasmid-DNA

500 ml LB-Medium supplementiert mit 50 μ g/ml Ampicillin wurden mit 2 ml einer Übernacht-Kultur beimpft. Bakterien mit pBR322 verwandten, amplifizierbaren Plasmiden wurden bis zur $OD_{600} = 0.8 - 1.0$ gezogen und 170 μ g CAP/ml LB-Lösung zugegeben, Bakterien mit pUC-Plasmid-Derivaten jedoch ohne CAP-Zugabe gezüchtet.

Die Zellen wurden am nächsten Tag im GS3-Rotor (8 000 rpm, 15 Min., 4°C) pelletiert und in 7 ml eiskalt m Sucrose-Puffer (15 % Sucrose, 50 mM Tris/HCl, pH 8. 50 mM EDTA) resuspendiert. Die Suspension wurde mit 8 mg Lysozym (in 200 μ l Sucrose-Puffer) 10 Min. auf Eis inkubiert und durch Zugabe von 9 ml Triton-Lysis-Mix (50 mM Tris/HCl, pH 8.0, 60 mM EDTA, 0.2 % Triton X-100) und weiteren 10 Min. auf Eis die Zellen aufgebrochen. Die Zelltrümmer und hochmolekulare, zelluläre DNA wurden im SS34-Rotor (20 000 rpm, 30 Min., 4°C) pelletiert und der plasmidhaltige Überstand dekantiert.

Im Überstand wurden 0.950 g CsCl/ml Lysat und 50 μ l Ethidiumbromid (10 mg/ml)/ml Lysat gelöst, in VTI50-Röhrchen gefüllt und im Vertikalrotor 18 Std. (15°C, 47 000 rpm) zentrifugiert. Die untere Bande, welche die supercoiled Form des Plasmids enthielt, wurde unter dem UV-Licht mit einer Spritze abgezogen und über einen zweiten CsCl-Gradienten aufgereinigt; es wurde dabei wie oben beschrieben verfahren. Das Ethidiumbromid wurde durch wiederholtes Ausschütteln mit wassergesättigtem Butanol entfernt und anschließend die Plasmid-haltige Lösung über Nacht gegen TE-Puffer dialysiert.

4. 2. Schnellpräparation von Plasmid-DNA

5 ml einer Übernacht-Kultur wurden in Eppendorf-Tubes abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 0.7 ml Puffer (8 % Sucrose, 0.5 % Triton X-100, 50 mM EDTA, 50 mM Tris/HCl pH 8.0) aufgenommen, 50 μ l Lysozym (10 mg/ml) zugegeben, 30 - 45 Sek. in kochendem Wasser erhitzt und für 10 Min. abzentrifugiert. Das visköse Pellet wurde abgehoben und der wässrige Überstand phenolisiert. Die DNA wurde mit dem gleichen Volumen Isopropanol 10 Min. bei Raumtemperatur gefällt, für 5 Min. bei 10 000 rpm abzentrifugiert, das Pellet in 200 μ l TE aufgenommen, mit Ethanol gefällt und die DNA in 20 μ l TE gelöst. Einem nachfolgenden Restriktionsenzymverdau wurden je 3 μ l DNA zusätzlich 1 μ l RNase (10 mg/ml) zugefügt.

4. 3. Isolierung hochmolekularer zellulärer DNA

Ca. 1×10^8 Zellen wurden in einer Lösung aus 30 ml TNE, 3 ml 10 % SDS und 300 μ l Proteinase K (10 mg/ml) aufgenommen, 15 Min. bei 50°C und anschließend 2 Std. bei 37°C inkubiert. Die DNA wurde phenolisiert und bildete nach der Ethanol-fällung einen Klumpen, der mit einer Pasteurpipette entnommen und in 5 ml TE-Puffer gelöst wurde. In einem zweiten Reinigungsschritt wurde die gelöste DNA mit RNase (100 μ g/ml) 30 Min. bei 37°C, mit Proteinase K (100 μ g/ml) 15 Min. bei 50°C und 2 Std. bei 37°C inkubiert. Die Proteine wurden durch Phenolisierung entfernt und die DNA (ca. 500 μ g) nach Ethanol-fällung in TE aufgenommen.

4. 4. Präparation von Lambda Phagen DNA

Zur Phagenaufzucht wurden 2.5 ml einer LE 392 Übernacht-kultur mit 25 μ l Phagen (Titer ca. 1×10^{10} pfu/ml) 20 Min. bei 38°C vorinkubiert, zu 250 ml LBM - Medium (38°C, 2 l Erlenmeyerkolben) pipptiert und bei 38° - 39°C geschüttelt. Nach ca. 5 - 8 Std. lysierten die Zellen.

Zum Lysat wurden NaCl in einer Endkonzentration von 0.5 M und 200 μ l Chloroform gegeben, die Zelltrümmer im GS3 Rotor (6 000 rpm, 15 Min., 4°C) abzentrifugiert und aus dem Überstand der Titer bestimmt.

Zur DNA - Präparation wurden im Lysat 10 % (w/v) Polyethylenglycol 8 000 (PEG) gelöst und anschließend für eine Stunde in Eiswasser gestellt. Das Pellet wurde im GS3 Rotor (6 000 rpm, 10 Min. 4°C) abzentrifugiert, in 5 - 10 ml TM (50 mM Tris, 10 mM $MgSO_4$)/1 Lysat resuspendiert, mit Chloroform ausgeschüttelt und im SS34 Rotor (4 000 rpm) die wässrige, Phagen enthaltende Phase vom PEG abgetrennt. Durch einen Glyzerin/TM-Stufengradienten im SW41 Rotor (35 000 rpm, 60 Min., 4°C) erfolgte eine weitere Aufreinigung der Phagen. Das Phagenpellet wurde in 1 ml TM resuspendiert und mit RNase (100 μ g/ml) und DNase (1 μ g/ml) 30 Min bei 37°C inkubiert. 5 x STEP-Puffer wurde bis zu 1/5 des Endvolumens zupipettiert, 15 Min. bei 50°C inkubiert, dann mit Phenol und abschließend mit Chloroform : Isoamylalkohol : Butanol (76 : 20 : 4) extrahiert. Nach Dialyse über Nacht gegen TI und Ethanol-fällung wurde die DNA in TE-Puffer aufgenommen.

5 x STEP-Puffer

0.5 % SDS

50 mM Tris, pH 7.5

0.4 M EDTA

1 mg/ml Proteinase K

Stufengradient

3 ml 40 % Glyzerin in TM

Überschichtet mit

4 ml 5 % Glyzerin in TM

4. 5. Elektroelution von DNA aus Agarosegelen

Zur Isolierung kleiner DNA-Fragmente bis zu 3 kb Länge aus Agarosegelen wurde die DEAE Membran NA-45 (Schleicher u. Schüll, Dassel) benutzt. Senkrecht zur eluierenden Bande wurde eine Tasche angebracht, ein schmales Stück Membran hineingesteckt und bei 100 V das Fragment ans Papier gebunden.

Die Membran wurde 5 Min. in N-LET (20 mM Tris/HCl, pH 8.0, 0.1 mM EDTA, 0.15 mM LiCl) gewaschen, in ein mit einem geringen Volumen an H-LET (20 mM Tris/HCl, pH 8.0, 0.1 mM EDTA, 1 M LiCl) gefülltes Eppendorfröhrchen gegeben und die DNA für 45 Min. bei 60°C vom Filter eluiert. Die Lösung wurde phenolisiert, mit dem 3 fachen Volumen an H-LET gesättigtem Butanol das Ethidiumbromid entfernt und die DNA mit Ethanol gefällt.

DNA - Fragmente größer als 3 kb wurden in einem Dialyseschlauch elektroeluiert (Maniatis, 1982).

5. Analyse von DNA

5. 1. Restriktionsenzymanalyse

Ein Restriktionsverdau zur Charakterisierung der DNA durch endonukleolytische Spaltung setzte sich zusammen aus der DNA, dem Restriktionsenzym, einem entsprechenden 10x-Puffer und TE ad X ml; inkubiert wurde bei 37°C (Sma I bei 25°C) für 1 - 5 Std. Der Verdau konnte anschließend durch Erhitzen für 10 Min. auf 65°C abgestoppt und die Fragmente auf einem Agarosegel analysiert werden. Im allgemeinen waren vier 10x - Puffersysteme mit unterschiedlichen Ionenstärken ausreichend, um eine zufriedenstellende Enzymaktivität zu erzielen. Alle Puffer enthielten 10 mM Tris/HCl, pH 7.5, 10 mM MgCl₂ und NaCl in Konzentrationen von 0, 50, 100 bzw. 150 mM und wurden entsprechend den Angaben des Herstellers (Boehringer, Mannheim) für das jeweilige Enzym verwendet.

5. 2. Agarose-Gelelektrophorese

Nach einem Restriktionsverdau wurden die DNA-Fragmente sowohl für analytische als auch für präparative Arbeiten auf einem Agarosegel aufgetrennt. Je nach Größe der erwarteten Fragmente enthielten die Gele zwischen 0.5 - 1.5 % Agarose, die durch Erhitzen in TGA-Puffer gelöst wurde. Die DNA-Proben wurden mit 1/10 Volumen Blaumarker (0.1 % Bromphenolblau in 80 % Glycerin) vermischt und in Ausspar-

ungen der Gele pipettiert; durch gleichzeitige Zugabe von Ethidiumbromid (50 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$) ins Gel konnte die DNA im UV-Licht (254 nm) sichtbar gemacht werden. Die Auftrennung der Fragmente erfolgte mit TGA-Puffer bei 50 - 100 V in Apparaturen der Fa. LKB.

5. 3. Nick-Translation

Für die Markierung von DNA mit ^{32}P dCTP wurde ein Nick-Translation-Kit der Fa. Amersham (Braunschweig) verwendet. Ein typischer Reaktionsansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

DNA	50 ng
Pufferlösung	5.0 μl
Enzymlösung	2.5 μl
^{32}P dCTP (1mCi/100 μl)	4.0 μl
A. bidest	ad 25.0 μl

Der Ansatz wurde für 1 Std. bei 15°C inkubiert und durch Zugabe von 5 μl 0.5 M EDTA abgestoppt. Durch Gelfiltration mit P60 wurden die freien Nukleotide von der markierten DNA abgetrennt. Die durchschnittliche spezifische Aktivität erreichte 3 - 5 $\times 10^8$ cpm/ μg DNA.

5. 4. Längenstandardmarkierung mit Klenow-Fragment

10 μg Hind III geschnittene Lambda-DNA (Fa. Boehringer, Mannheim) wurden phenolisiert und nach Ethanol-fällung in 40 μl TE aufgenommen. Die Markierung der Fragmente erfolgte durch das Auffüllen der Enden mit dNTP und ^{32}P dCTP mit DNA Polymerase I (Klenow-Fragment). Die Reaktion wurde nach 25 Min. bei Raumtemperatur mit 6 μl 0.5 M EDTA gestoppt und die markierte DNA von den Nukleotiden durch Gelfiltration mit P60 abgetrennt.

5. 5. Southern Blotting

Zum Transfer von DNA aus Agarosegelen auf Nitrozellulose-Filter wurde das Kapillarblotting-Verfahren (Southern, 1975) nach der Vorschrift von Maniatis (1982) angewandt.

5. 6. Hybridisierung mit ^{32}P -markierter DNA

Sämtliche Hybridisierungsexperimente wurden mit Nitrozellulosefiltern (BA 45, 0.45 μm ; Schleicher und Schüll) unter stringenten Bedingungen durchgeführt (erfaßt Sequenzen mit 84 % Homologie zur Proben-DNA bei Hybridisierung bzw. 94 % Homologie beim 65°C Waschschrift). Die NC-Filter wurden in Folien eingeschweißt und ein ausreichendes Volumen der Lösungen in die Beutel pipettiert. Die Vorhybridisierung dauerte 2 Std., die Hybridisierung über Nacht (jeweils 42°C im Wasserbad).

Das Waschen der Filter am darauffolgenden Tag erfolgte in 3 Schritten: Bei Raumtemperatur für 30 Min. in einer Lösung aus 0.5 x Denhardt, 2 x SSC, 0.1 % SDS und je 3 x 5 Min. in 2 x SSC, 0.1 % SDS; abschließend wurde in 0.1 x SSC, 0.1 % SDS bei 65°C mindestens 2 x 20 Min. inkubiert, bis die Aktivität Werte unter 20 Impulse/Sek. erreichte. Die Filter wurden getrocknet, in Kunststoffhüllen verpackt und mit Verstärkerfolie auf einem Kodak XAR 5 Film bei -70°C exponiert.

Lösungen

	<u>Vorhybridisierung</u>	<u>Hybridisierung</u>
Formamid	50 %	50 %
20 x SSC*	5x	5x
100 x Denhardt ⁺	5x	5x
Naphosphat, pH 6.5	0.05 M	0.02 M
Glycin	1 %	
Lachssperma-DNA*	0.2 mg/ml	50 $\mu\text{g/ml}$
Dextransulfat		1.2 %
^{32}P DNA**		1-2x10 ⁶ cpm/ml

⁺ je 2 % (w/v) Ficoll, Polyvinyl-Pyrrolidin und BSA in Aqua dest.

* 1 x SSC: 0.15 M NaCl, 15 mM Nacitrat

** Denaturiert bei 95°C, 10 Min.

5. 7. RNase T₁ - Fingerprintanalyse

Zur Charakterisierung der viralen RNA wurde die RNase T₁ - Fingerprintanalyse angewandt. Hierzu wurden die viralen Partikel entsprechend Kap. I/9 gewonnen, die RNA isoliert und diese anschließend mit RNase T₁ vollständig gespalten. Die entstehenden Oligonukleotide sind von unterschiedlicher Größe und charakterisiert durch ein einzelnes G-Nukleotid am 3'-Ende.

Die terminalen Phosphatreste wurden mit alkalischer Phosphatase entfernt und die Fragmente am 5'-Ende mit (Gamma-³²P) ATP durch die T4-Polynukleotid-Kinase markiert. Die Auftrennung erfolgte anschließend auf Polyacrylamidgelen in zwei Dimensionen. Die einzelnen Schritte entsprechen dem Protokoll von Pedersen (1980).

Die Auftrennung der Oligonukleotide im zweidimensionalen Gel erfolgte sowohl entsprechend ihrer Größe als auch ihrer Basenzusammensetzung. Die vertikale Isoplethe am äußersten linken Rand enthält keine Oligonukleotide mit Uridin-Resten, die folgende Isoplethe mit jeweils einen Uridin-Rest usw. Im mittleren Abschnitt der Fingerprints sind die Isoplethe auf Grund der komplexen Muster schwierig zu erkennen.

Innerhalb einer Isoplethe erfolgte die Verteilung der Oligonukleotide entsprechend ihres Anteils an A und C Resten. Im unteren Teil der Isoplethe sind die Oligonukleotide mit einem relativ hohen Anteil an A-Resten, im oberen Teil mit einem relativ hohen Gehalt an C-Resten lokalisiert. Die relative Zusammensetzung eines Oligonukleotides kann somit aus der Lage im zweidimensionalen Muster vorausgesagt werden. Die Bestimmung der exakten Zusammensetzung ist jedoch nur durch eine Sequenzanalyse der Oligonukleotide möglich.

6. Klonierungsmethoden

6. 1. Ligierung mit T4-DNA-Ligase

Zur Verknüpfung von DNA-Fragmenten mit überstehenden oder mit stumpfen Enden wurden beide Fragmente im äquimolaren Verhältnis miteinander gemischt. Zu je 100 - 200 ng der DNA wurden 2 μ l 5x Ligierungspuffer (100 mM Tris/HCl, pH 7.6, 50 mM MgCl₂, 50 mM dTT, 3 mM ATP) und 1 U T4-DNA-Ligase gegeben, das Volumen auf 10 μ l mit TE aufgefüllt und über Nacht bei 12°C inkubiert. Der Verdau wurde bei 65°C (5 Min.) abgestoppt und ein Aliquot für die Verpackungsreaktion oder für die Transformation eingesetzt.

6. 2. Alkalische Phosphatase-Behandlung von DNA

Um zu vermeiden, daß Vektor-DNA mit sich selbst religierte, wurden die terminalen Phosphatreste durch Alkalische Phosphatase entfernt. Nach Beendigung des Restriktionsverdau wurden 10 U des Enzyms direkt zum Ansatz gegeben, 30 Min. bei 37°C inkubiert und zur Inaktivierung 10 Min. bei 65°C mit 20 mM EGTA ((Ethylenglycol-bis(2-aminoethyl-ether)-N,N'-tetraessigsäure)) erhitzt. Die DNA wurde zweimal phenolisiert, mit Ethanol präzipitiert und in die Ligasereaktion eingesetzt.

6. 3. T4-DNA-Polymerase-Behandlung von DNA

Um 3' überstehende Enden, wie sie nach Restriktionsenzymverdau mit Pst I oder Kpn I entstehen, in stumpfe Enden überzuführen, wurde die DNA mit T4-DNA-Polymerase behandelt.

In einem Volumen von 30 μ l wurden 0.5 - 2 μ g DNA mit 3 μ l 10 x T4-Puffer (330 mM Tris/Acetat, pH 7.9, 660 mM Kacetat, 100 mM Mgacetat, 5 mM dTT, 1 mg/ml BSA), je 1 mM dNTP (alle vier Nukleotide) und 2 U T4-DNA-Polymerase für 20 Min. bei 37°C inkubiert. Das Enzym wurde 15 Min. bei 65°C inaktiviert, phenolisiert und die Ethanol gefällte DNA in 10 μ l TE resuspendiert. Die Fragmente können anschließend in die Ligierung eingesetzt werden.

6. 4. Klonieren in pUC- und M13-Vektoren

pUC-Plasmide und M13-Phagenvektoren enthalten eine Polylinkersequenz, die im Gen für das alpha-Peptid der β -Galactosidase lokalisiert ist (Messing, 1981; Vieira, 1982). Mit pUC-Plasmiden transformierte Bakterien bzw. M13 Phagen, die auf einem Nährmedium supplementiert mit X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl-D-galactopyranosid, 4 mg/100 ml) wachsen, spalten dieses Substrat und es bildet sich an der Luft ein Indigofarbstoff. Wird in die Polylinkersequenz DNA eingebaut, kann das hydrolytische Enzym und damit die blaue Farbe nicht mehr ausgebildet werden. Die Färbung der Kolonien bzw. Plaques ist somit ein System, um auf rekombinante Vektoren zu selektionieren. Die Indikatorbakterien für pUC-Plasmide waren JM83, welche im Chromosom das fehlende Peptid für die alpha-Komplementation tragen; M13-Phagen wurden auf JM105 vermehrt, welche auf dem F-Epison das entsprechende β -Galactosidase-Proteinfragment kodieren. Bei M13-Phagen wurde zusätzlich als Induktor Isopropylthiogalactosid (IPTG) zugegeben, welches den lac-Repressor effektiv bindet, aber durch die β -Galactosidase nicht verwertet werden kann.

6. 5. Klonieren ecotroper Proviren

6. 5. 1. Lokalisierung der Provirusintegrationsorte

Zur Identifizierung ecotroper Provirusintegrationen wurden 10 μ g zelluläre DNA mit Eco RI verdaut und die Fragmente auf einem 0.8 % Agarosegel aufgetrennt. Eine vollständig geschnittene DNA ergab einen gleichmäßigen Schmier über alle Fragmentlängen und eine für murine DNA spezifische Satellitenbande bei 1.5 kb .

Die Probe zur Erkennung der proviralen Integrationsstelle war ein 400 bp langes Sma I - Fragment des AKV-Retrovirus, lokalisiert zwischen 6.6 - 7.0 kb des env-Gens und spezifisch für ecotrope Retroviren (Chattopadhyay, 1980). Diese ecospezifische Probe wurde mit Eco RI aus dem Plasmid

geschnitten, durch Nick-Translation mit ^{32}P dCTP markiert und unter stringenten Bedingungen gegen die in einem Southern-Blot an Nitrozellulose gebundene, Eco RI geschnittene DNA hybridisiert.

6. 5. 2. Isolierung von DNA-Fragmenten aus genomischer DNA

Zur selektiven Anreicherung von DNA-Fragmenten zur Klonierung wurden 200 μg DNA vollständig mit Eco RI geschnitten und auf einem präparativen 0.8 % Agarosegel bei 30 V über Nacht aufgetrennt. Da Ethidiumbromid in die DNA interkaliert und bei Bestrahlung mit UV-Licht Mutationen verursachen kann, wurde das Gel nur kurz angefärbt. Aus dem Agarosegel wurden Teile entsprechend den gesuchten Fragmentlängen ausgeschnitten und die DNA in einem Dialyseschlauch mit TGA-Puffer eluiert. Die DNA wurde über eine NACS-Säule aufgereinigt, mit Ethanol gefällt und je 3 μg DNA in 20 μl TE aufgenommen.

6. 5. 3. Präparation der Vektorarme von λ Phagen-Vektoren

Für die Klonierung wurden die Phagen-Vektoren λ Charon 4a und λ gt wes. λ B verwendet. Diese Substitutionsvektoren haben eine Kapazität von 7 - 20 kb bzw. von 2.2 - 15.1 kb (Maniatis, 1982). Die 5' - bzw. 3' - terminalen Fragmente enthalten alle für den lytischen Zyklus des Phagen essentiellen Gene und Regulationssequenzen sowie die cos-sites, welche für die Konkatermerbildung notwendig sind. Sie werden im folgenden als Arme bezeichnet und müssen von dem zentralen Füllfragment ("stuffer") abgetrennt werden. Die DNA wurde wie beschrieben isoliert und je 100 μg DNA mit Eco RI verdaut. Eco RI geschnittene Charon 4a-DNA ergibt nach Auftrennung im Agarosegel vier Fragmente: Den linken Arm mit 19.9 kb und den rechten Arm mit 11.1 kb. Das "stuffer"- Fragment zerfällt in zwei Abschnitte von 6.6 kb und 7.8 kb (Abb. 1). Da die Arme über die cos-sites des Phagen zum Teil wieder zusammenklebten, erscheint die

Bande bei 20 kb überrepräsentiert. Die λ - Arme wurden aus dem Gel ausgeschnitten, die DNA elektroeluiert und über eine NACS-Säule gereinigt.

Die einzelnen Fragmente mußten sich nach dem Verdau mit T4- DNA-Ligase wieder religieren lassen. Diese Kontrolle zeigte die Intaktheit der Überstehenden Enden an (Abb. 1, Spur 2).

Die Vektorarme von λ gt wes. λ B (linker Arm 21.7 kb, rechter Arm 13.4 kb) wurden analog zu Charon 4a präpariert.

6. 5. 4. Ligasereaktion

Sowohl das Verhältnis der DNA-Fragmente als auch ihre Konzentration ist für den Erfolg der Ligierung und der Verpackungsreaktion von entscheidender Bedeutung. Die drei Reaktionspartner sollten ein äquimolares Verhältnis bilden; da das Insert zwei reaktive Enden, die Arme jedoch nur je eines besitzen, ist die optimale Relation linker Arm : Insert : rechter Arm = 2 : 1 : 2. Die Konzentration der DNA im Ligierungsansatz sollte größer als 210 $\mu\text{g/ml}$ sein (Maniatis, 1982). Damit wird die Wahrscheinlichkeit der Ausbildung intermolekularer Verbindungen erhöht, während die Zirkularisierung des Inserts unterdrückt wird. Um die rekombinante DNA effizient zu verpacken, müssen auf der DNA wenigstens zwei Kopien der cos-sites vorhanden sein und ihre Entfernung voneinander mindestens 39 kb, aber höchstens 51 kb betragen.

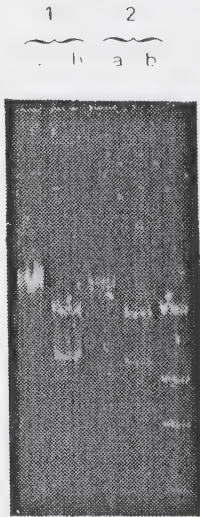


Abb. 2

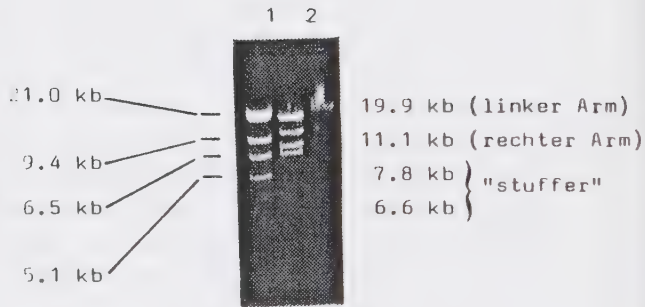


Abb. 1

Abb. 1 Restriktionsenzymverdau von λ Charon 4a-DNA mit Eco RI.

- 1) Charon 4a-DNA / Eco RI
- 2) Charon 4a-DNA / Eco RI / religiert

Abb. 2 Ligierung von NIH/RFB - DNA mit λ Charon 4a - Armen.

Gereinigte Charon 4a Arme (Eco RI) und Eco RI geschnittene NIH/RFB DNA: a) nach Ligase Zugabe

b) vor Ligase Zugabe

1) Fraktion II

2) Fraktion II

Zur Klonierung des RFB-Provirusgenoms (Kap. 2. 1.) wurden 1.8 μ g der Charon-4a-Arme und je 600 ng der zu klonierenden Fragmente (Fraktionen I und II getrennt) über Nacht in einem Volumen von 10 μ l ligiert. Vor Zugabe der T4-DNA Ligase und nach der Ligierung wurde ein 1 μ l Aliquot entnommen und die DNA auf einem Agarosegel aufgetrennt (Abb. 2). In den Spuren 1b und 2b sind bei 19.9 kb und 11.1 kb die Vektor-Arme zu erkennen. Ansatz I enthielt die Fragmente der Fraktion I (Spuren 1), Ansatz II die Fragmente der Fraktion II (Spuren 2). Nach der Ligierung (Spuren 1a und 2a) waren die distinkten Banden verschwunden; über der Bande bei ca. 50 kb, die wahrscheinlich den Monomeren aus Armen und Insert entspricht, sind die gebildeten konkatemeren Formen als feiner Schmier zu erkennen.

Die ligierte DNA wurde in einem in vitro-System wie in Kap. 6. 5. 5. beschrieben in die λ -Phagenköpfe verpackt. Die Verpackung der Fragmente im Bereich von 10 - 15 kb ergab 1×10^6 pfu/ μ g rekombinanter DNA (I), im Bereich von 15 - 20 kb 0.7×10^6 pfu/ μ g rekombinanter DNA (II). Bei der Klonierung der OS-5 ClO-Provirusintegrationen wurden in je 10 μ l Volumen 900 ng

λ gt wes. λ B - Arme mit 0.3 μ g Insert aus Fraktion II bzw. 1 μ g Charon 4a Arme mit 0.75 μ g Insert aus Fraktion I ligiert. Die Verpackung ergab je 2×10^5 pfu/ μ g rekombinanter DNA bei Ansatz I und 3×10^5 pfu/ μ g rekombinanter DNA bei Ansatz II.

6. 5. 5. Verpackung rekombinanter Phagen-DNA

Die Proteinextrakte für die Verpackung der λ -Konkatemere in die Phagenköpfe wurden von der Firma Boehringer, Mannheim bezogen. 15 μ l Ultraschallextrakt und 10 μ l Lysat wurden langsam in Eis aufgetaut und mit 3 μ l des Ligierungsansatzes vermischt. Nach 1 Stunde Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Ansatz mit 300 μ l TMG - Puffer verdünnt, mit einem Tropfen Chloroform gemischt und für 2 Min. abzentrifugiert. Zur Bestimmung des Phagentiters wurden 10 μ l des Lysats in TMG verdünnt, je 100 μ l mit 200 μ l LE392 MgSO_4 -Bakterien* und 3 ml TOP-Agar gemischt, auf TBM-Platten verteilt und über Nacht bei 37°C inkubiert.

* MgSO_4 -Bakterien

Die Bakterien wurden in TB-Medium bei 30°C und 200 rpm über Nacht geschüttelt, für 10 Min. abzentrifugiert und in 10 mM MgSO_4 resuspendiert ($\text{OD}_{600} = 0.5$).

6. 5. 6. Plaque-Lift und Hybridisierung

Die Platten mit den Phagen wurden auf 4°C abgekühlt, die Nitrozellulosefilter markiert, auf den TOP-Agar gelegt und die Markierung auf die Platten übertragen, um die Phagenplaques später reidentifizieren zu können. Die Membran wurde nach 20 Min. bei 4°C vorsichtig wieder abgelöst; das Muster der Plaques war hiermit auf das Filter kopiert. Zur Fixierung wurden die Filter abwechselnd für je 30 Sek. in 0.1 N NaOH, 1,5 M NaCl, in 0.2 M Tris/HCl, pH 7.5 und in 2 x SSC getaucht, anschließend getrocknet und 2 Std. bei 80°C gebacken.

Die Hybridisierung erfolgte unter stringenten Bedingungen ohne Zugabe von Dextransulfat mit 1×10^6 cpm/ml Hybridisierungslösung wie beschrieben. Auf die gewaschenen Filter wurde ein Röntgenfilm gelegt, für 20 Sek. bei Rotlicht vorbelichtet, um die Markierungen auf den Film zu

übertragen und über Nacht exponiert. Die positiven Plaques konnten durch Übereinanderlegen von Film und Petrischale wiedergefunden werden.

7. Sequenzanalyse mit der Dideoxymethode nach Sanger (1977)

Voraussetzung für diese Methode ist das Vorliegen einzelsträngiger (ss) DNA und ein Primerfragment, welches als Startpunkt für die Synthese des komplementären Stranges durch die DNA Polymerase I (Klenow Fragment) benutzt wird. Zwei unterschiedliche Systeme stehen zu Verfügung, um ss-DNA zu erhalten.

7. 1. M13-Sequenzierung

M13 ist ein einzelsträngiger, filamentöser Phage, der während seiner Replikation eine doppelsträngige (ds)-Zwischenstufe (Replikative Form) durchläuft. Beide Formen können getrennt isoliert werden und bilden die Basis für die Klonierung (ds-DNA) bzw. Sequenzierung (ss-DNA) von Fremd-DNA. Messing und Mitarbeiter (Yanisch-Perron, 1985) entwickelten eine Reihe von Vektoren (z. B. M13 mp18) mit einem Polylinker, in welchem DNA bis zu max. 5 kb stabil eingebaut werden kann und mit dem β -Galaktosidase Komplementationssystem zur Selektion auf rekombinante Phagen.

Die Präparation von ss- und ds-DNA des M13 Phagen erfolgte entsprechend dem von der Fa. Amersham, Braunschweig herausgegebenen Handbuch (M13 cloning and sequencing handbook).

7. 1. 1. Erzeugung von Deletionsmutanten zur Sequenzierung

7. 1. 1. 1. Exonuklease III/SI-Nuklease-Verdau

Die von Henikoff (1984) beschriebene Methode ermöglichte die selektive, gerichtete Deletion eines Inserts im M13-Vektor unter Konservierung der Primer Bindungsstelle (Abb. 3).

5 μ g M13mpl8/OS-5 ClO - DNA wurden mit je 10 U Sph I und Sal I in 20 μ l für 2 Std. geschnitten. Die DNA wurde mit Ethanol gefällt, in 50 μ l Puffer (60 mM Tris/HCl, pH 8.0, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT) aufgenommen, 10 μ l Exo III (67 000 U/ml) zugegeben und bei 37°C inkubiert. Im Abstand von 30 Sek. wurden Aliquots von 2.5 μ l entnommen, mit 7.5 μ l 0.2 M NaCl und 5 mM EDTA vermischt und das Enzym 10 Min. bei 70°C inaktiviert. Unter diesen Bedingungen wurden in 30 Sek. ca. 200 Nukleotide vom 3'-Ende des Inserts entfernt. Die DNA wurde mit Ethanol gefällt, in 50 μ l SI-Puffer (0.25 M NaCl, 30 mM Naacetat, pH 4.6, 1 mM ZnSO₄, 5 % Glycerin, 67 Vogt U/ml SI-Nuklease) gelöst und 30 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde mit 6 μ l Puffer (0.5 M Tris/HCl, pH 8.0, 0.125 M EDTA) abgestoppt und phenolisiert.

Zum Auffüllen der Enden wurde die DNA in 10 μ l 20 mM Tris/HCl, pH 8.0, 7 mM MgCl₂ und 10 U Klenow-Enzym gemischt, für 2 Min. bei 37°C und für weitere 2 Min. mit 1 μ l dNTP (je 0.125 mM, alle 4 Nukleotide) inkubiert. Die Religierung der stumpfen Enden erfolgte in 10 μ l Volumen bei Raumtemperatur für 4 Stunden. Kompetente JM105-Zellen wurden mit 3 μ l des Ligierungsansatzes transformiert, über Einzelplaques doppelsträngige DNA isoliert und auf einem 1 % Agarosegel aufgetrennt. Abb. 4 zeigt die sequentiellen, gerichteten Deletionen des Inserts über 5 Min. Die einzelsträngige DNA der verschiedenen Klone wurde direkt in die Sequenzreaktion eingesetzt.

7. 1. 1. 2. Bal 31 - Verdau

Die Methode von Poncz (1982) basierte auf einem gerichteten, aber nicht selektiven Verdau der Vektorinsertion (Abb. 5).

5 μ gmp18/OS5 C10-DNA wurden mit Sal I im Polylinker 3' vom Insert geschnitten. Das Enzym wurde für 10 Min. bei 65°C inaktiviert, 3 μ l Bal 31 (0.75 U/ μ l) zugefügt und in 150 μ l Bal 31-Puffer verdaut. Alle 30 Sek. wurden Aliquots von 5 μ l entnommen, die Proben phenolisiert und die DNA nach Ethanol-fällung in 10 μ l TE aufgenommen. Die DNA wurde 5' vom Insert mit Eco RI geschnitten und der Vektor auf einem Agarosegel vom Insert abgetrennt (Abb. 6). Das verkürzte Insert wurde mit einer DEAE-Membran isoliert.

Die mit Sma I und Eco RI geschnittene mp18 DNA wurde mit den gereinigten Insertfragmenten ligiert und in kompetente JM105-Zellen transformiert. Je fünf weiße Plaques pro Probe wurden durch Verdünnungsausstrich gereinigt, einzelsträngige DNA isoliert und in die Sequenzreaktion eingesetzt.

7. 2. Plasmid-DNA Sequenzierung

Als zweites System wurde die direkte Sequenzierung von ds-DNA in Plasmidvektoren angewandt. Es bietet mehrere Vorteile:

- Eine zeitraubende Reklonierung in M13 entfällt, da die DNA direkt aus einem Plasmidvektor sequenziert werden kann.
- Die Präparation der Plasmid-DNA erfolgt in einem Schnellaufschlußverfahren nach Birnboim (1979).

Die Präparation der Plasmid-DNA und die DNA-Sequenzierung erfolgte nach dem von der Fa. Boehringer, Mannheim ausgegebenen Handbuch (Heinrich, 1984).

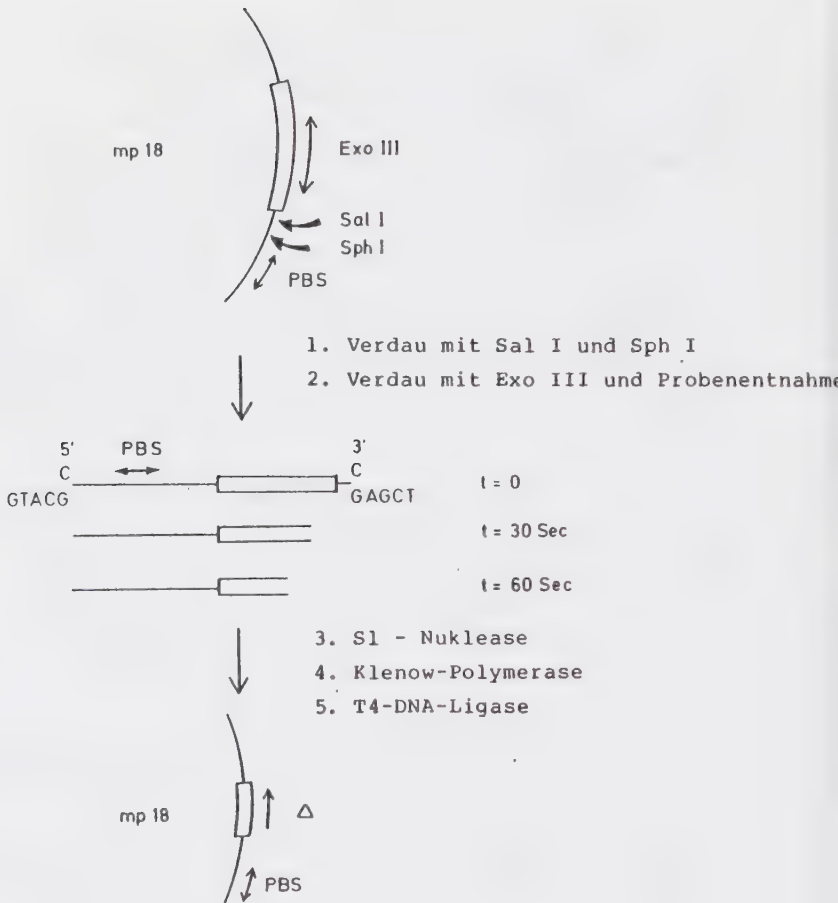


Abb. 3 Schematische Darstellung von Deletionsmutanten nach Henikoff (1984).

△ Deletionen

PBS Primer-Bindungsstelle

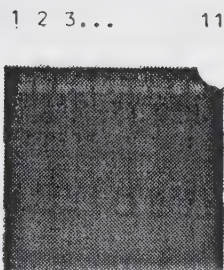


Abb. 4

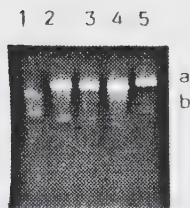


Abb. 6

Abb. 4 Sequentieller, gerichteter Verdau von
doppelsträngiger mpl8/OS-5 - Klon 7 - DNA (Sal I/
Sph I geschnitten) mit Exo III/S1 - Nuklease über
fünf Minuten.

Spur 1 zeigt die DNA vor der Nuklease Behandlung,
die Spuren 2 - 11 entsprechen den Fragmenten
nach jeweils weiteren 30 Sek. Nuklease Behandlung.

Abb. 6. Bal 31 - Verdau von mpl8/OS-5 - Klon 5 DNA (Sal I/
Eco RI) über vier Minuten.

a) mpl8/Sal I/Eco RI

b) Insert

Spur 5 zeigt die DNA (Sal I/Eco RI) vor der
Nuklease Behandlung, die Spuren 1 - 4 entsprechen
Proben nach jeweils einer weiteren Minute Bal 31-
Verdau.

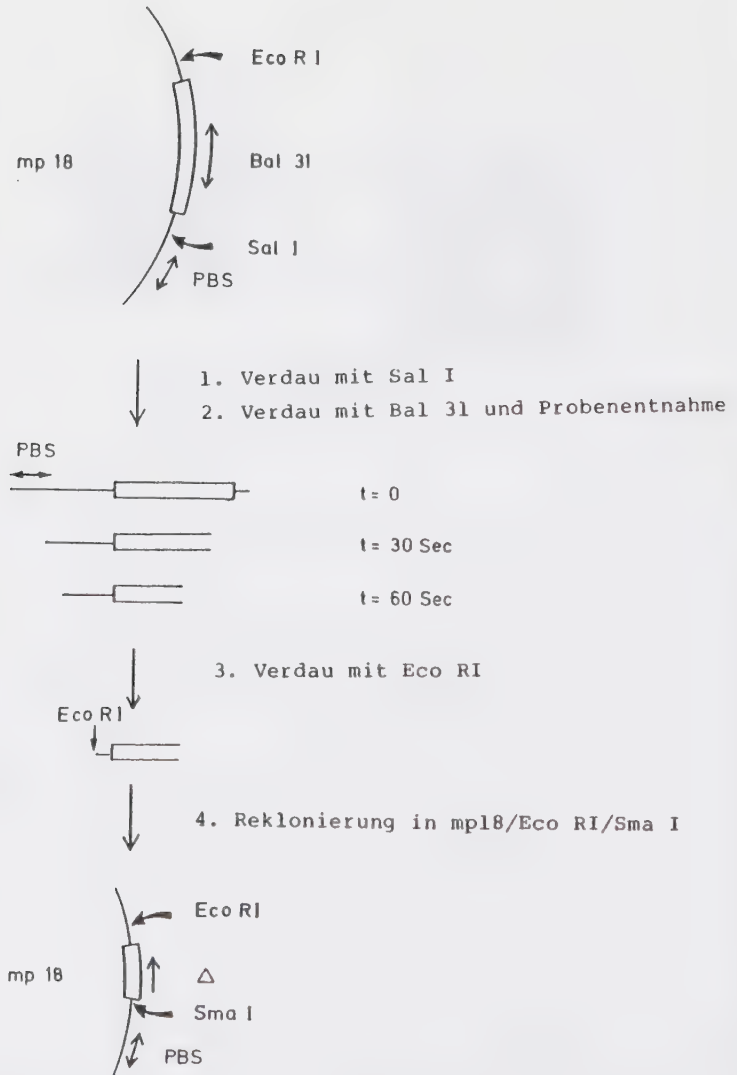


Abb. 5 Deletionsmutanten nach Poncz (1982)

△ Deletionen

PBS Primer-Bindungsstelle

8. Konstruktion der CAT-Plasmide

Basis für die Klonierung der viralen Transkriptions-Kontrollelemente war der Shuttle-Vektor pUC CAT1 (Lipp, 1987), der sich aus dem pUC12-Vektor und Teilen des pSV2 CAT-Plasmids zusammensetzte (Abb. 7). Der pUC12-Anteil enthielt den "origin of replication" und das Ampicillin-resistenzgen zur Vermehrung und Selektion in Bakterien. In den Polylinker des Vektors pUC12 war das Gen für die Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT), die Signalsequenzen für die 5'- und 3'- Spleißstelle und die Polyadenylierungsstelle aus dem Plasmid pSV2 CAT (Gorman, 1982) eingebaut. Die SV40 Promotor- und Enhancersequenzen aus pSV2 CAT waren deletiert und 5' von CAT konnten somit beliebig Promotor- und Regulationssequenzen vorgeschaltet werden.

Die Pst I - Kpn I-Fragmente, welche die viralen Promotor- und Enhancerelemente enthielten, wurden aus folgenden Klonen isoliert:

Plasmidbezeichnung	Pst I - Kpn I (Position im LTR)
pOA6CAT (Leib-Mösch, 1986)	40 - 460 (geschätzt)
pAKV6CAT (Etzerodt, 1984)	40 - 518
pUC9-OS5C10-LTR	40 - 419
pUC9-RFB-K1-LTR	40 - 502

Die einzelnen Klone wurden mit Pst I - Kpn I geschnitten, die Fragmente in einem 1.5 % Agarosegel aufgetrennt, auf Grund ihrer aus den Sequenzdaten vorausberechneten Größe identifiziert und isoliert.

Da im Polylinker des pUC CAT1-Vektors 5' von der CAT-Region weder Schnittstellen für Pst I (CTGCA G) noch für Kpn I (GGTAC C) lokalisiert waren, wurde die Sma I - Schnittstelle (CCC GGG) zur Klonierung ausgewählt (Abb. 7). Vor der Ligierung mußten jedoch die 3' überstehenden Enden der Insertionen in stumpfe Enden umgewandelt werden, um sich mit der Sma I - Schnittstelle des Vektors verbinden zu können.

Alle DNA-Polymerasen synthetisieren den komplementären Strang nur in 5' - 3' Richtung und mit einem Primer als Startstelle. Die durch Pst I - Kpn I gebildeten 3' überstehenden Enden stellen somit im allgemeinen kein Substrat für Polymerasen. Um stumpfe Enden zu erhalten, wurde deshalb die T4-DNA-Polymerase ausgewählt. Sie besitzt neben ihrer Polymerasefunktion noch eine starke 3' - 5' Exonukleaseaktivität, mit der die 3' überstehenden Enden entfernt werden können. Sie stoppt zwar nicht am Doppelstrang, die entstehenden Lücken können jedoch gleichzeitig mit ihrer 5' - 3' Polymerase-Aktivität wieder aufgefüllt werden. Das Klenow-Fragment war wegen seiner geringen Exonukleaseaktivität für diese Reaktion nur bedingt geeignet.

Der Sma I geschnittene Vektor wurde mit Alkalischer Phosphatase dephosphoryliert, um eine Rezirkularisierung zu vermeiden. 100 ng des Vektors wurden in 10 µl Volumen mit 200 ng des T4-DNA-Polymerase behandelten Inserts ligiert. Da die Ligierung von Molekülen mit stumpfen Enden relativ ineffizient verläuft, konnte nur eine geringe Zahl an Transformanten mit rekombinanten Plasmiden erwartet werden. Gleichzeitig war im pUC CAT1-Vektor durch die Insertion des CAT Gens das β-Galaktosidase Selektionssystem nicht mehr funktionsfähig.

Zur Identifizierung von Transformanten mit einer LTR Insertion im Plasmid wurden eine Koloniehybridisierung durchgeführt. Die Kolonien wurden in Analogie zu einem Plaque-Lift auf Nitrozellulosefilter übertragen. Die Filter wurden für je 10 Min. in 0.5 M NaOH, in 1 M Tris/HCl, pH 7.4, in 0.5 M Tris/HCl, pH 7.4, 1.5 M NaCl und in 2 x SSC inkubiert, anschließend an der Luft getrocknet und für zwei Stunden bei 80°C gebacken. Durch Hybridisierung mit der Akv-LTR spezifischen Probe konnten die positiven Kolonien herausgefiltert werden. Von 100 Kolonien waren im Durchschnitt 20 Kolonien positiv.

Das Insert kann mit gleicher Wahrscheinlichkeit in zwei möglichen Orientierungen in die Sma I-Stelle eingebaut werden. Der Promotorbereich befindet sich entweder 5' in unmittelbarer Nähe des CAT-Gens (und nur in dieser Anordnung ist er aktiv) oder aber die Enhancerregion wird vor dem CAT-Gen inseriert (der Promotor ist dann entgegengesetzt der Leserichtung und inaktiv).

Zur Analyse der Orientierung des Promotor-/ Enhancer-Fragmentes wurde ein Verdau mit Eco RI und Eco RV durchgeführt. Entsprechend dem Einbau des Inserts unterscheiden sich die Fragmentlängen nach dem Restriktionsenzymverdau. Eco RI schneidet im Polylinker des pUC Vektors und im CAT-Gen, während Eco RV im Enhancerbereich der U3-Region eine Schnittstelle erkennt. Aus den Sequenzdaten ließ sich die Länge der erwarteten Fragmente berechnen und aus der Analyse des DNA-Musters nach dem Doppelverdau mit Eco RI und Eco RV die jeweilige Orientierung des Inserts erkennen. Abb. 8 zeigt die Analyse am Beispiel von CAT1-RFB. In Teil I ist die physiologisch aktive Orientierung dargestellt, Teil II zeigt die nicht aktive Anordnung.

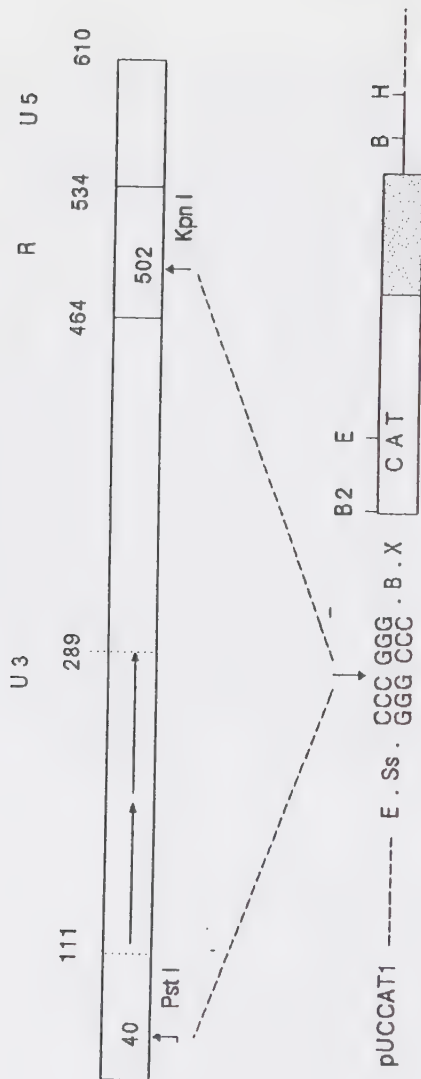


Abb. 7 Subklonierung des Pst I/Kpn I - Fragmentes der RFB-LTR in den Vektor pUC CAT 1.

Das gepunktete Segment des pUC CAT 1 - Vektors enthält die Donor/Akzeptor Splicing- und die Polyadenylierungssignale.

E: Eco RI; B: Bam HI; B2: Bgl II; Ss: Sst I; X: Xba I; H: Hind III.

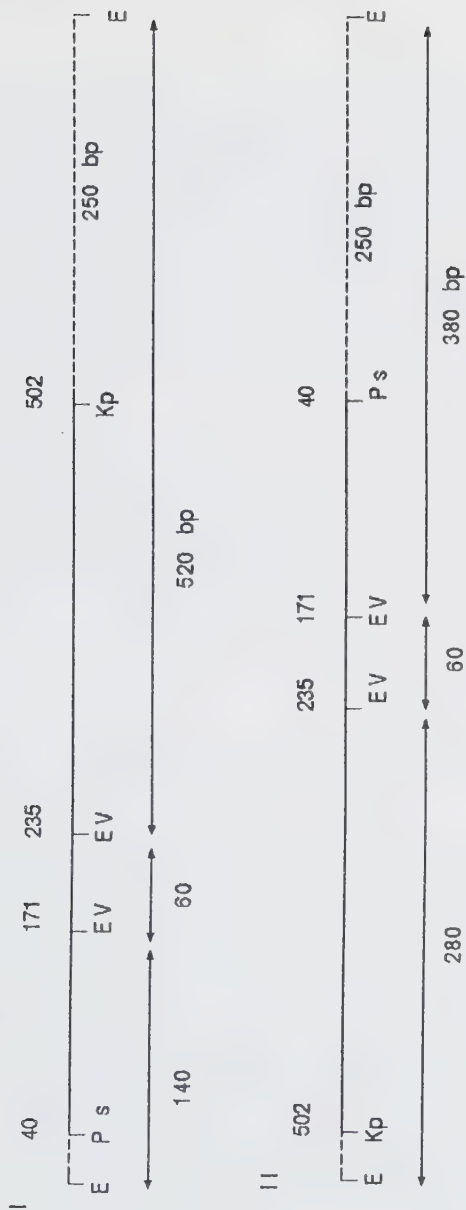


Abb. 8 Bestimmung der Orientierung des Pst I/Kpn I - LTR-Fragmentes von RFB MuLV nach Klonierung in den pUC CAT1 - Vektor.
LTR-Sequenzen sind mit durchgezogenen Linien, pUC CAT1 - Sequenzen gestrichelt gezeichnet.

Abkürzungen: E: Eco RI; EV: Eco RV; Kp: Kpn I.

9. Chloramphenicol-Acetyltransferase-Test (CAT-Assay)

9. 1. Herstellung des Zellextraktes

4,5 μ g der supercoiled-Form eines Plasmides, welches das CAT-Gen enthält, wurden in Säugerzellen transfiziert. Nach dem Glyzerinschock wurden die Zellen für weitere 48 Std. inkubiert. Zum Abernten wurden die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen, 1 ml TNE zugegeben, nach ca. 5 Min. mit einem Gummischaber von der Kulturschale gelöst und in ein Eppendorf-Gefäß pipettiert. Die Zellen wurden pelletiert (30 Sek., 10 000 rpm, 4°C), in eiskaltem Tris/HCl (0.25 M, pH 7.8) resuspendiert und bei -20°C tiefgefroren. Der Zellaufschluß erfolgte in drei Zyklen durch Einfrieren in flüssigem Stickstoff und anschließendem Auftauen im 37°C Wasserbad (je 4 Min). Durch Zentrifugation (10 Min., 10 000 rpm, 4°C) wurden die Zelltrümmer vom proteinhaltigen Überstand abgetrennt. Der Überstand konnte danach für mehrere Wochen bei -20°C ohne Aktivitätsverlust des CAT-Enzyms aufbewahrt werden.

9. 2. Proteinbestimmung

Die Menge an Protein im Extrakt wurde nach der Methode von Bradford (1976) bestimmt. In Mikrotiterplatten wurden zu 230 μ l Comassie Brilliant Blue Lösung* 20 μ l einer 1 : 500 Extraktverdünnung pipettiert und nach fünf Minuten bei Raumtemperatur die Extinktion bei 577 nm bestimmt. Durch Vergleich der Werte mit einer Eichkurve aus Rinder-serumalbumin konnten die Proteinkonzentrationen ermittelt werden.

* 100 mg Comassie Brilliant Blue G (Serva, Heidelberg) wurden in 50 ml Ethanol gelöst und für eine Stunde gerührt. Nach Zugabe von 100 ml konzentrierter Phosphorsäure wurde weitere fünf Minuten gerührt, 850 ml A. bidest zugegeben, die Lösung filtriert und bei 4°C aufbewahrt.

9. 3. Testansatz

Jeweils 25 μ g des proteinhaltigen Zellextraktes, 25 μ l Acetyl-CoA (4 mM), 1.5 μ l ^{14}C Chloramphenicol (CAP, 57.8 $\mu\text{Ci}/\text{mmol}$, NEN, Dreieich) und 0.25 M Tris/HCl, pH 7.8 ad 180 μ l wurden im Eis gemischt, für 45 Min. bei 37°C im Wasserbad inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 400 μ l eiskaltem Ethylacetat abgestoppt. Die Lösung wurde auf dem Whirl-Mix gemischt, 3 Min. zentrifugiert (10 000 rpm), die obere, organische Phase, welche das CAP enthält, abpipettiert und die wässrige Phase mit dem gleichen Volumen an Ethylacetat nachverrahert. Die beiden Überstände wurden vereinigt, in der Gefriertrocknung eingeengt und das Pellet in 20 μ l Ethylacetat aufgenommen. Die Trennung der acetylierten von der nicht-acetylierten Form erfolgte durch Dünnschicht-Chromatographie (DC-Plastikfolien, Kieselgel 60; Fa Merck) mit Chloroform : Methanol (95 : 5) als Laufmittel. Das Chromatogramm wurde an der Luft getrocknet und über Nacht mit einem XAR-5 Röntgenfilm bei Raumtemperatur exponiert. Die Intensität der Flecken wurde auf einem Ultrosan XL Laser Densitometer (LKB) mit automatischer Peakintegration quantitativ ausgewertet.

Das nicht umgesetzte Chloramphenicol befindet sich zuunterst, dann folgen 1-Acetyl-Chloramphenicol und 3-Acetyl-Chloramphenicol. Die diacetylierte Form (1, 3-Diacetyl-Chloramphenicol) tritt nur in minimalen Mengen auf, wenn das Substrat fast vollständig verbraucht wurde.

Die quantitative Auswertung wird in % -Konversionsrate angegeben. Sie ist definiert als der Prozentsatz an Chloramphenicol, welcher in die acetylierte Form umgewandelt wird.

Abb. 9 zeigt den zeitlichen Verlauf eines CAT-Assays während 75 Minuten. Nach dieser Zeit ist das Substrat fast vollständig verbraucht und die Reaktion befindet sich nicht mehr im linearen Bereich.

15	30	45	60	75	Zeit (Min.)
23	40	70	90	90	Konversionsrate (%)

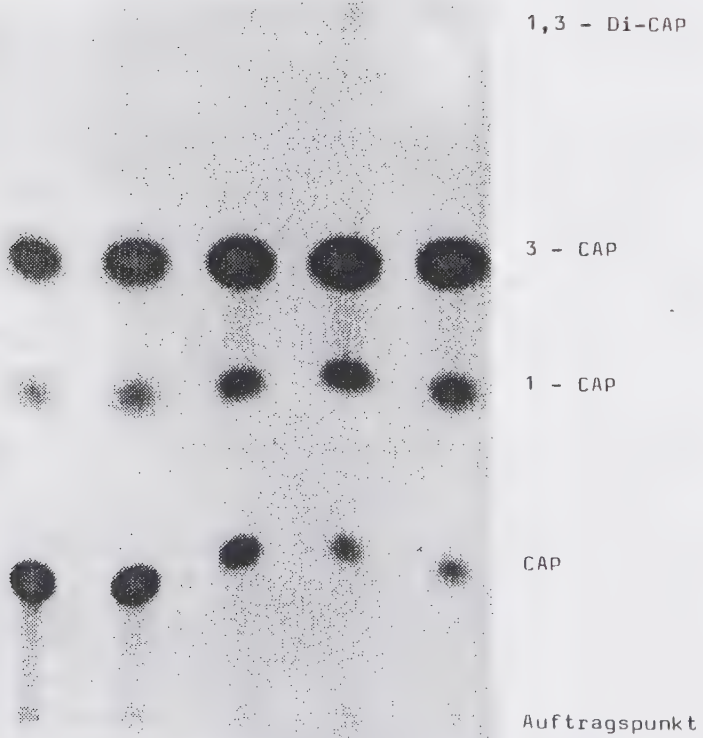


Abb. 9 Chromatogramm eines CAT-Assays über 75 Min. mit Probenintervallen von 15 Min.

C: ERGEBNISSE

1. Biologische Aktivität osteotroper Retroviren

Für die in vivo-Experimente wurden die vier murinen Retrovirusisolate Akv-, OA-, RFB- und OS-5 MuLV ausgewählt, die in der Einleitung bereits näher beschrieben worden sind. Die Pathogenität der Retrovirusisolate RFB- und OS-5 MuLV wurde in NMRI-Mäusen getestet und mit der biologischen Aktivität von Akv- und OA MuLV verglichen.

Die Ergebnisse der in vivo - Versuche sind in Tabelle 1 zusammengefaßt. Die NMRI-Kontrolltiere, denen lediglich Kulturmedium injiziert wurde, zeigten eine Spontanrate an Lymphomen von 20 %. Knochenveränderungen traten über einen Versuchszeitraum von 1.5 Jahren bei keinem der Tiere auf. Die murinen Retrovirusisolate OA-, OS-5-, Akv- und RFB MuLV induzierten mit einer Inzidenz von 67 % - 100 % maligne Lymphome. Mit zunehmender Lymphomhäufigkeit erniedrigte sich parallel hierzu die Latenzzeit bis zur Manifestation der Erkrankung von 350 Tagen bei OA MuLV auf 200 Tage bei RFB MuLV.

Auch in ihrer Fähigkeit, Knochenveränderungen zu induzieren, wichen die einzelnen Isolate gravierend voneinander ab. Akv MuLV zeigte mit 45 % die niedrigste Osteopetroserate, während RFB MuLV in allen infizierten NMRI-Mäusen Osteopetrose induzierte. OS-5 MuLV zeigte ein ähnliches Verhalten wie Akv MuLV, bei OA MuLV lag die Wahrscheinlichkeit mit 73 % zwischen den beiden Extremwerten. Die mittlere Latenzzeit bis zur Evidenz der Erkrankung war mit mehr als 300 Tagen bei allen Isolaten extrem lang.

Charakteristisch für die einzelnen Isolate war außerdem die Morphologie der Osteome. OS-5-, OA- und Akv MuLV induzierten an wenigen Stellen im Skelett Knochenveränderungen, die nur einen kleinen Durchmesser aufwiesen. RFB MuLV dagegen verursachte in ein und derselben Maus multiple, proliferierende Osteome.

Abb. 10 zeigt das Röntgenbild einer mit RFB MuLV infizierten NMRI-Maus, deren Krankheitsbild durch multiple Osteome und Osteopetrose gekennzeichnet war.

RFB MuLV war damit eindeutig das biologisch aktivste Isolat. OS-5 MuLV zeigte eine geringfügig erhöhte Virulenz zu Akv MuLV, während OA MuLV eine niedrige Lymphomrate bei hoher Knochentumorinzidenz aufwies.

Die in vivo Daten ergaben also bei einem identischen Pathogenitätsspektrum signifikante Unterschiede in der Häufigkeit von Akv-, OA-, OS-5- und RFB MuLV induzierten Neoplasien.

Mit den folgenden Experimenten sollte deshalb versucht werden, die strukturelle Basis für das onkogene Verhalten der einzelnen Isolate besser zu verstehen.

<u>Virustyp</u>	<u>Malignes Lymphom</u>	<u>Osteopetrose</u>	<u>Osteom</u>
Kontrollen ⁺	2/10 * (20 %)	376 ± 168** 0/10	544 0/10
RFB MuLV	10/10 (100 %)	201 ± 44 10/10 (100 %)	201 ± 44 4/10 (40 %)
OA MuLV	10/15 (67 %)	350 ± 74 11/15 (73 %)	356 ± 45 4/15 (27 %)
Akv MuLV	20/22 (90 %)	293 ± 89 10/22 (45 %)	308 ± 96 3/22 (13 %)
OS-5 MuLV	17/21 (80 %)	318 ± 100 11/21 (52 %)	369 ± 47 4/21 (19 %)
			544 243 ± 41 381 ± 45 461 ± 92 387 ± 29

Tabelle 1 Pathogenität zellfreier Extrakte von virusproduzierenden NIH 3T3 - Zelllinien

* Zahl erkrankter Tiere / Zahl infizierter Tiere

** mittlere Latenzzeit

.. NMRI-Kontrolltiere, injiziert mit zellfreiem Überstand von NIH 3T3 - Zellen



Abb. 10 Röntgenbild des Skeletts einer mit RFB MuLV infizierten NMRI-Maus mit multiplen Osteomen.

2. RNase T₁ - Fingerprintanalyse von RFB- und OS-5 - RNA

Zu einer ersten Analyse des Genoms der leukämogenen, osteotropen murinen Retroviren RFB und OS-5 wurde die RNase T₁-Fingerprinttechnik angewandt. Diese Methode ermöglichte die Charakterisierung von 10 % - 15 % des viralen Genoms durch die zweidimensionale Auftrennung von ca. 100 RNase T₁-resistenten Oligonukleotiden. Die einzelnen Oligonukleotide verteilen sich zufällig über das gesamte Genom. Die Analyse ist sensitiv für den Austausch einzelner Basen, jedoch nicht für Deletionen oder Insertionen im Genom. Die RNase T₁ - Fingerprintanalyse sollte damit einen Überblick geben über die Organisation der viralen Genome und die Verwandtschaft der Isolate RFB MuLV und OS-5 MuLV zueinander.

Die Viren zur RNA Gewinnung wurden aus dem Zellkulturüberstand von infizierten NIH 3T3 - Zellen isoliert. NIH 3T3 ist eine permanente Fibroblastenzelllinie einer NIH/Swiss - Maus, die keine retroviralen Partikel produziert. Diese Zellen wurden daher mit dem Überstand einer RFB MuLV produzierenden Zelllinie (ATCC VR-909) bzw. mit dem Überstand einer OS-5 MuLV produzierenden NMRI-Zelllinie (Erfle, 1986) infiziert und als permanente, virusproduzierende Linien (NIH/RFB bzw. NIH/OS-5) etabliert. Die virale RNA wurde aus den Partikeln isoliert und eine Fingerprintanalyse durchgeführt.

Abb. 11 zeigt den RNase T₁ - Fingerprint der RFB - Virus-RNA. Als Basis für die Auswertung der Fingerprints diente das Oligonukleotidmuster von Akv MuLV, dem endogenen, ecotropen Provirus der AKR-Maus. Das Oligonukleotidmuster ist bei RFB MuLV von einer einheitlichen Struktur; alle Oligonukleotide sind in molaren Verhältnissen vertreten. Dies zeigt die Anwesenheit einer einzelnen viralen Komponente im Zellkulturüberstand.

Die Oligonukleotide Nr. 9 und 13 B fehlen bei RFB MuLV im Vergleich zu Akv MuLV.

Das rechts neben Nr. 9 neu auftretende Oligonukleotid ist wahrscheinlich aus diesem durch eine Punktmutation entstanden. Die Doppeloligonukleotide Nr. 23 A + B und Nr. 45 B + C aus der Akv-RNA sind in der RFB-RNA nur als einzelne Oligonukleotide vorhanden. Zwei weitere Oligonukleotide erscheinen zusätzlich zum Akv-Muster.

Für den Tropismus des Virus entscheidend sind die Oligonukleotide Nr. 31 und 23. Ein Doppeloligonukleotid bei Nr. 23 kennzeichnet N-trope, bei Nr. 31 B-trope Viren (Rommelaere, 1979; Ou, 1983; DesGroseillers, 1983). Beide sind bei RFB MuLV jedoch nur als einzelnes Oligonukleotid vorhanden. Da RFB MuLV sich in NIH 3T3-Zellen vermehrt, ist es demzufolge wahrscheinlich ein NB-tropes Virus, welches sowohl in Zellen mit dem Fv-1^{n/n} als auch mit dem Fv-1^{b/b} Allel replizieren kann. Ein spezifischer Marker für NB-Tropismus existiert nicht. Da jedoch auch Veränderungen in benachbarten Regionen den Tropismus mitbestimmen können, ist eine endgültige Aussage darüber nur nach einem Tropismus-Test in der Zellkultur möglich.

Die RNase T₁ - Fingerprintanalyse der OS-5 - RNA ist in Abb. 12 dargestellt. Man erkennt neben dem für Akv verwandte MuLVs typischen Muster, welches den Hauptbestandteil der Oligonukleotide bildet, einige nur in submolaren Quantitäten vorhandene Oligonukleotide. Dies deutet auf die Anwesenheit von mehr als einer viralen Komponente im OS-5 - Isolat und demnach auf ein Gemisch von mindestens zwei Retrovirustypen.

Die Hauptkomponente von OS-5 MuLV, das zu Akv MuLV verwandte Virus, wurde durch eine dreifache Endpunktverdünnung von den Begleitviren abgetrennt. Abb. 13 zeigt die Fingerprintanalyse des endpunktverdünnten OS-5 Virus (OS-5/EP). OS-5/EP besteht im Gegensatz zu OS-5 aus einer homogenen Viruspopulation, dessen RNase T₁ - Fingerprint nur minimale Veränderungen zu dem von Akv MuLV zeigt.

Im OS-5/EP - Muster fehlt das Oligonukleotid Nr. 34, welches in der LTR-Region lokalisiert ist (Abb. 14). Im Vergleich zur Akv-RNA wird ein weiteres Oligonukleotid zusätzlich gefunden. Das Doppeloligonukleotid Nr. 23 A + B ist vorhanden und läßt deshalb auf ein N-tropes Retrovirus schließen.

In den oberen Bereichen des Fingerprints ist die Auftrennung der Oligonukleotide auf Grund ihrer Größe und Basenzusammensetzung sehr ineffizient. Eine Beurteilung dieser Oligonukleotide war deshalb nicht möglich.

Die Sequenz von 80 Akv RNase T_1 -resistenten Oligonukleotiden wurde von Pedersen (1980) bestimmt; die einzelnen Oligonukleotide konnten auf Grund der Sequenzanalyse des gesamten Akv-Genoms durch Etzerodt (1984) der retroviralen DNA zugeordnet werden (Pedersen, 1986). In Abb. 14 ist schematisch die Verteilung der Oligonukleotide auf dem Akv-Genom dargestellt. Im Vergleich dazu sind die bei der RFB RNA bzw. OS-5 RNA fehlenden Oligonukleotide durch einen Kreis gekennzeichnet.

Eine exakte Zuordnung der Doppeloligonukleotide 45 A/B bzw. 23 A/B ist nicht möglich, da unbekannt ist, welches der beiden Oligonukleotide fehlt. Von 70 identifizierten Oligonukleotiden bei RFB MuLV sind 66 Oligonukleotide, bei OS-5 MuLV 69 Oligonukleotide identisch zu Akv MuLV. Das heißt, es besteht eine Homologie von 94 % der RNase T_1 -resistenten Oligonukleotide zwischen Akv- und RFB MuLV und von 98 % zwischen Akv- und OS-5 MuLV im Bereich der mit dieser Methode erfaßten Sequenzen.

Die murinen Leukämieviren RFB und OS-5 weisen also auf der Basis der RNase T_1 - Fingerprintdaten nur geringfügige Abweichungen voneinander und zu Akv MuLV auf. Es scheint deshalb eine enge Verwandtschaft der Genome von Akv-, RFB- und OS-5 MuLV zu bestehen. Trotz des hohen Homologiegrades von größer als 94 % bei den RNase T_1 resistenten Oligonukleotiden zeigen die einzelnen Isolate voneinander abweichende, charakteristische Pathogenitätsmuster. Weiterführende molekularbiologische Analysen sollten deshalb die strukturelle Organisation der viralen Genome näher bestimmen.

Abb. 11 a) RNase T_1 -Fingerprintanalyse von RFB-RNA
 b) Schematische Darstellung der RNase T_1 -Fingerprintanalyse von Akv-RNA im Vergleich zu RFB-RNA (Zur Verfügung gestellt von Pedersen, Universität Aarhus, DK). Die gefüllten Kreise entsprechen zusätzlichen Oligonukleotiden, fehlende Oligonukleotide sind schraffiert.

a



b



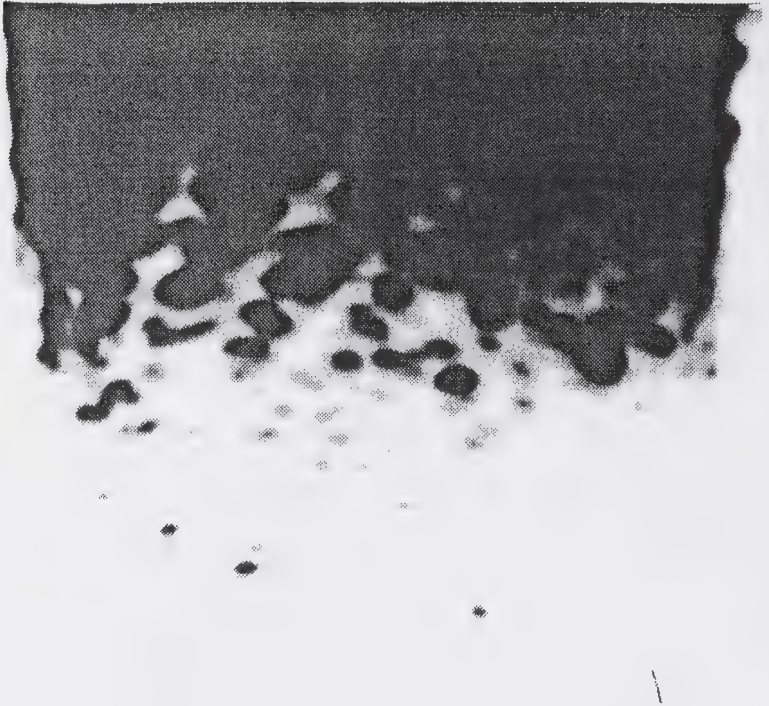
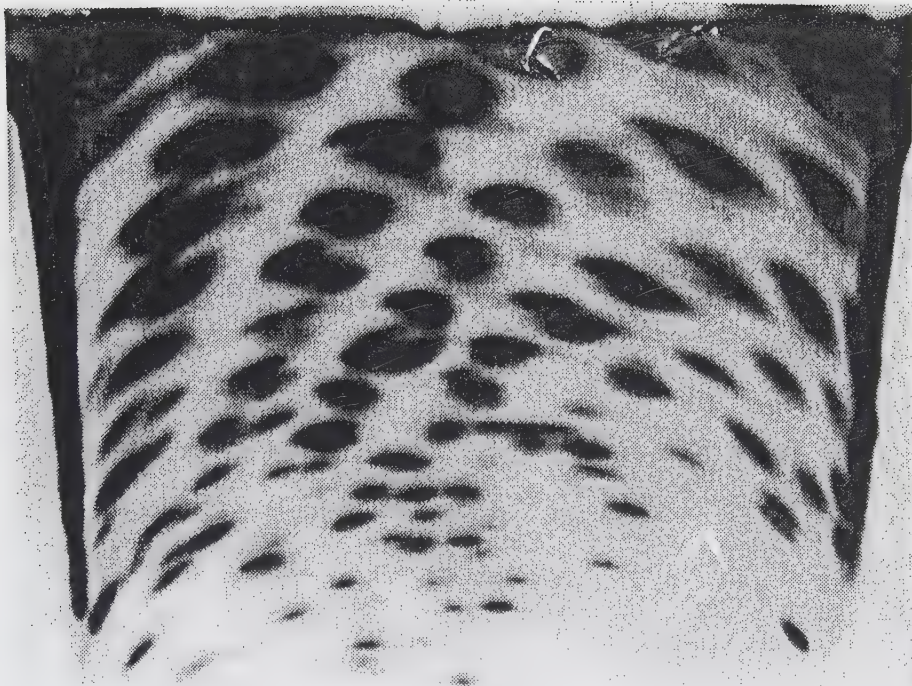


Abb. 12 RNase T_1 -Fingerprintanalyse von OS-5 - RNA

- Abb. 13 a) RNase T_1 -Fingerprintanalyse von OS-5/EP - RNA.
b) Schematische Darstellung der RNase T_1 -Fingerprintanalyse von Akv-RNA im Vergleich zu RFB-RNA. Der gefüllte Kreis entspricht den zusätzlichen Oligonukleotiden, das fehlende Oligonukleotid ist schraffiert.

a



b



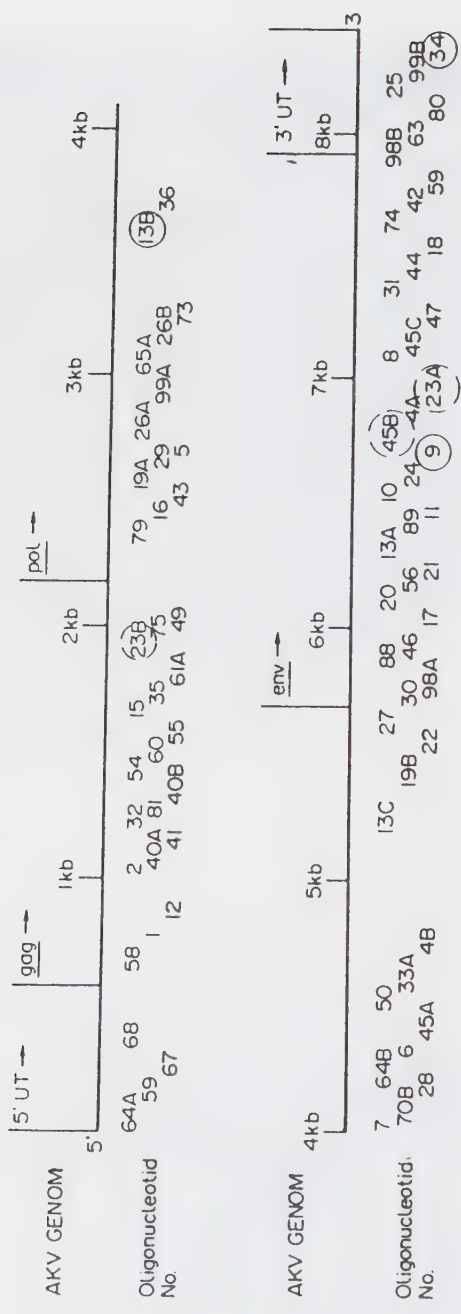


Abb. 14 Verteilung der Oligonukleotide auf dem AKV-Genom und Vergleich zum RFB- und OS-5/EP Genom (übernommen aus Pedersen, 1986). Die Zahlen mit durchgezogenen Kreisen entsprechen fehlenden Oligonukleotiden; bei gestrichelten Kreisen ist die Lokalisierung nicht genau bekannt.

3. Das murine Leukämievirus RFB

3. 1. Molekulare Klonierung des RFB-Provirusgenoms

Um das RFB-Virus molekular zu klonieren, wurden zelluläre Klone der mit RFB MuLV infizierten NIH 3T3 - Zelllinie etabliert.

NIH 3T3 - Zellen enthalten keine endogenen ecotropen Proviren in ihrem Genom (Coffin, 1984), so daß jede Neuintegration in die DNA auf eine Infektion durch RFB MuLV zurückgeführt werden konnte. Die Retrovirusintegration in die murine DNA erfolgt statistisch (Varmus, 1982). Deshalb mußten für die Untersuchung des Integrationsmusters in der genomischen DNA aus der Zelllinie NIH/RFB Einzelzellklone isoliert werden.

Zehn Klone wurden über mehrere Passagen vermehrt und die Freisetzung von viralen Partikeln durch Reinfektion von NIH 3T3-Zellen im IPF-Test nachgewiesen. Ein Klon, NIH/RFB-K7, wurde wegen seiner effizienten Virusproduktion für die weiteren Versuche ausgewählt. Durch RNase T₁ - Fingerprintanalysen konnte außerdem nachgewiesen werden, daß die RNA der von den einzelnen zellulären Klonen produzierten retroviralen Partikel untereinander und mit dem Originalisolat (NIH/RFB) identisch waren (hier nicht gezeigt).

Das Integrationsmuster in der NIH/RFB-K7-Zelllinie wurde durch einen Eco RI-Verdau analysiert. Dieses Restriktionsenzym schneidet nicht im Genom ecotroper Proviren (Chattopadhyay, 1980); die Banden nach Hybridisierung mit dem für ecotrope Viren spezifischen Fragment entsprechen damit der Zahl an RFB-Provirusintegrationen.

Abb. 15 zeigt in Spur 2 zwei Integrationsstellen des ecotropen RFB - Provirusgenoms von 14 kb und 18 kb Länge. In Spur 3 ist als Kontrolle für eine spezifische Hybridisierung Eco RI geschnittene DNA der Balb/c Maus aufgetragen, deren endogenes, ecotropes Provirus ein ca. 20 kb großes Fragment ergibt (Horowitz, 1985).

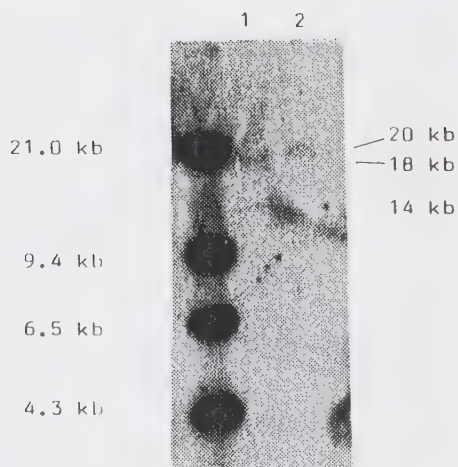


Abb. 15 Integrationsmuster ecotroper Proviren in
NIH/RFB- und Balb/c - DNA.

1) RFB-K7 - DNA/Eco RI

2) Balb/c - DNA/Eco RI

Die molekulare Klonierung des RFB-Provirusgenoms erfolgte aus der Zelllinie NIH/RFB-K7. Die isolierte DNA wurde mit dem Restriktionsenzym Eco RI geschnitten. Alle Eco RI - Fragmente zwischen 10 - 15 kb (Fraktion I) und 15 - 20 kb (Fraktion II) wurden aus einem präparativen Agarosegel selektiv angereichert und im Lambda-Phagenvektor Charon 4a eine partielle Genbank angelegt.

Aus Fraktion I konnten nach Screening mit der ecotrop-spezifischen Probe sechs positive Klone aus 2×10^5 Plaques, aus Fraktion II drei positive Klone aus 1.5×10^5 Plaques identifiziert werden, die in ihrem rekombinanten Genom Provirus-Integrationsstellen enthielten.

Die Analyse der Phageninsertionen mit Eco RI zeigte in den untersuchten Klonen aus Ansatz I je eine Bande von 14 kb (RFB/MBK 6), aus Ansatz II je eine Bande von 18 kb (RFB/MBK 1). Die in der NIH/RFB-K7 - DNA integrierten RFB-Provirusgenome wurden somit molekular kloniert.

3. 2. Physikalische Kartierung der klonierten RFB-Provirusgenome

Die meisten ecotropen Retroviren enthalten je eine einzelne Pst I-Schnittstelle in den flankierenden LTRs (Chattopadhyay, 1982). Mit diesem Restriktionsenzym konnte deshalb eine Größenbestimmung der Provirusgenome vorgenommen werden. Der Pst I-Verdau zeigte bei allen Klonen jeweils eine Bande bei 8.4 kb, d. h. die Länge der RFB-Proviren entspricht einer vollen Genomlänge ohne größere erkennbare Deletionen.

Das Vorgehen beim Erstellen einer Restriktionskarte soll hier exemplarisch am Beispiel der Zuordnung der Pst I- und Pvu I-Fragmente von RFB/MBK-1 dargestellt werden. Nach einem Verdau von RFB/MBK 1 - DNA mit Pst I und anschließender Hybridisierung mit der im env-Gen lokalisierten eco-Probe, erhielt man eine Bande von 8.4 kb (Abb. 16, Spur 1).

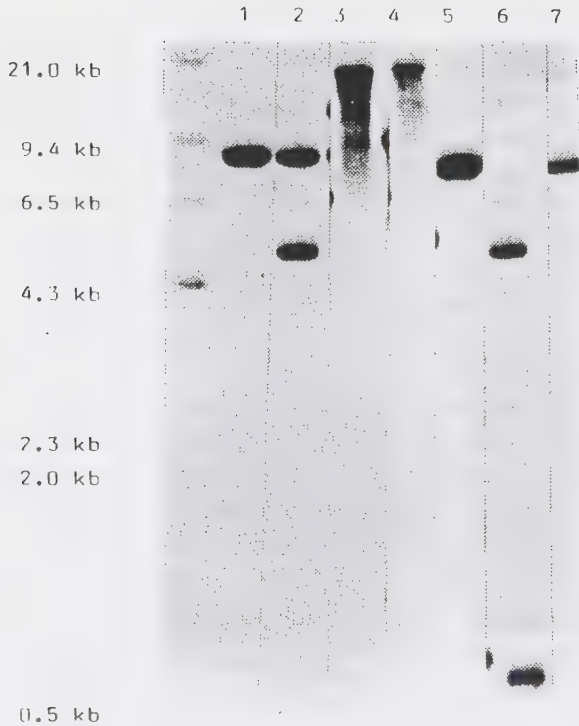


Abb. 16 Restriktionsenzymkartierung von RFB/MBK 1 DNA am Beispiel des Pst I und Pvu I - Verdaus. Die DNA der Spalten 1, 3 und 5 wurde mit der spezifischen Probe für ecotrope Viren, die von 2 und 6 mit der LTR-Probe und die von 4 und 7 mit der Akv-Gesamt-Probe hybridisiert. Die Bande bei 3.3 kb in Spur 4 bzw. von 0.7 kb in Spur 7 ist in der Originalautoradiographie eindeutig zu identifizieren.

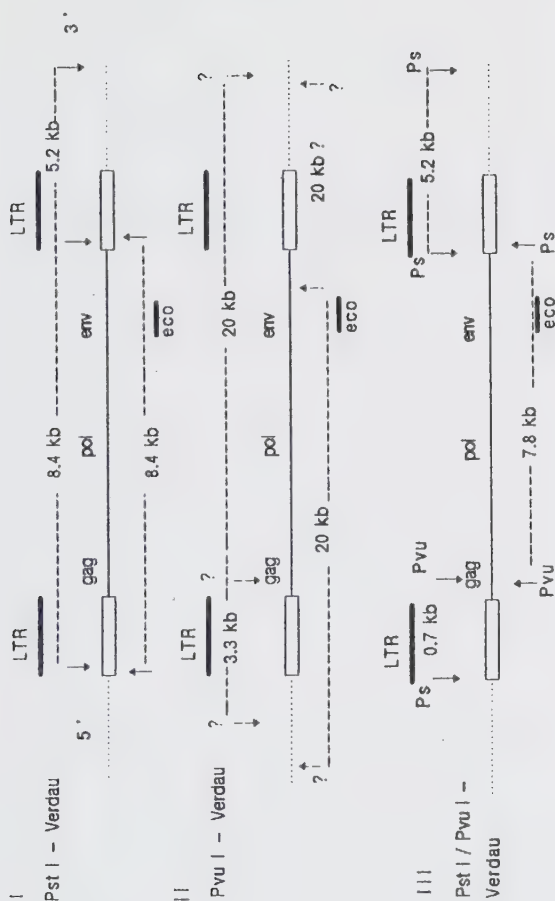


Abb. 17 Schematische Darstellung der Restriktionsenzymkartierung von RFB/MBK 1 DNA am Beispiel des Pst I- und Pvu I-Verdau.

Lokalisierung der Hybridisierungsproben

LTR

provirales Genom

Das Provirusgenom flankierende, murine Sequenzen

Lokalisierung der Fragmente nach Restriktionsenzymverdau

Nach Hybridisierung mit einer LTR-Sequenz spezifischen Probe (Pst I/Kpn I - Fragment der Akv-LTR) ergab sich wiederum die Bande von 8.4 kb sowie eine weitere von 5.2 kb (Abb. 16 , Spur 2).

Es war bekannt, daß in den LTRs ecotroper Retroviren eine Pst I-Schnittstelle am 5'-Ende der U3-Region lokalisiert ist (Chattopadhyay, 1982). Da die LTRs sowohl am 5'- als auch am 3'-Ende der viralen DNA in direkter Wiederholung angeordnet sind, ließ sich bei der eco-Probe die 8.4 kb Bande zwischen die Pst I-Stellen der viralen DNA zuordnen; durch Hybridisierung der LTR-Probe mit dem 5'-terminalen Repeat wurde die gleiche Bande nochmals erkannt (Abb. 17/I). Die 5.2 kb Bande umfaßte demnach den 3'-terminalen Repeat mit den anliegenden zellulären Sequenzen. Der Pvu I verdaut λ Klon, hybridisiert mit der eco-Probe, ergab ein 20 kb Fragment, mit der Akv-Gesamt- bzw. der LTR-Probe ein 20 kb und ein 3.3 kb Fragment (Abb. 16, Spur 3 u. 4). Die Pvu I-Schnittstelle konnte maximal 3.3 kb 3' von der 5'-LTR lokalisiert sein, da ansonsten ein weiteres Pvu I-Fragment nach Hybridisierung mit der Akv-Gesamt-Probe auftreten müßte (Abb. 17/II). Aber auch die entgegengesetzte Orientierung wäre möglich.

Eine genaue Zuordnung der Bruchstücke wurde erst durch einen Doppelverdau mit den Enzymen Pst I und Pvu I ermöglicht.

Die Hybridisierung mit der eco-Probe zeigte nach dem Doppelverdau nur noch ein Fragment von 7.8 kb (Abb. 16, Spur 5). Das bedeutete, daß die Distanz von der Pst I- zur 5' davon gelegenen Pvu I-Schnittstelle 7.8 kb war (Abb. 17/III). Die Gesamtlänge der viralen DNA zwischen den beiden Pst I - Schnittstellen beträgt 8.4 kb. Nach Hybridisierung der Pst I/Pvu I geschnittenen DNA mit der LTR-spezifischen Probe ergab sich ein 0.7 kb Fragment sowie ein 5.2 kb langes Pst I - Pst I Fragment, deren

Schnittstellen in der 5'-LTR und im 5' zellulären Randbereich lokalisiert waren (Abb. 16, Spur 6; Abb. 17/III). Der 7.8 kb lange, mit der eco-Probe hybridisierende Teil war dagegen nicht sichtbar. Bei Hybridisierung mit der Akv-Gesamt-Probe waren dagegen alle drei Fragmente zu erkennen (Abb. 16, Spur 7).

Basierend auf den bereits festgelegten Restriktionsenzym-schnittstellen konnte in Kombination mit weiteren Restriktionsenzymverdaus eine physikalische Kartierung beider RFB-Klone durchgeführt werden.

Zur weiteren Kartierung der Schnittstellen wurden beide Klone mit insgesamt zehn verschiedenen Restriktionsenzymen (Eco RI; Bam HI; Bgl II; Hind III; Pst I; Pvu I; Kpn I; Xba I; Sal I; Sma I) geschnitten. Um die viralen Fragmente selektiv von den flankierenden zellulären Sequenzen zu unterscheiden, wurde die DNA durch einen Doppolverdau mit Pst I (schneidet in den terminalen Repeats) und einem der oben angegebenen Restriktionsenzyme analysiert. Die Hybridisierung erfolgte mit den folgenden Proben:

- Die λ Klone RFB/MBK-1 und RFB/MBK-6 mit sich selbst, um alle auftretenden Fragmente sichtbar zu machen.
- mit pAKR-59, einem Plasmid mit dem gesamten Akv-Genom, um die viralen Fragmente zu bestimmen.
- mit dem Vektor Charon 4a, um die Phagenanteile im Restriktionsmuster zu identifizieren.
- mit dem ecotrop-spezifischen Fragment
- mit der LTR-Sequenz aus Akv MuLV.

In Abb. 18 ist die Restriktionsenzymkarte des RFB-Provirusgenoms mit den Schnittstellen von neun Restriktionsenzymen dargestellt. Die Verteilung der Restriktionsenzymkennungsstellen bei den Klonen MBK 1 und MBK 6 ist identisch. Die zellulären Randfragmente sind unterschiedlich und spezifisch für den Integrationsort.

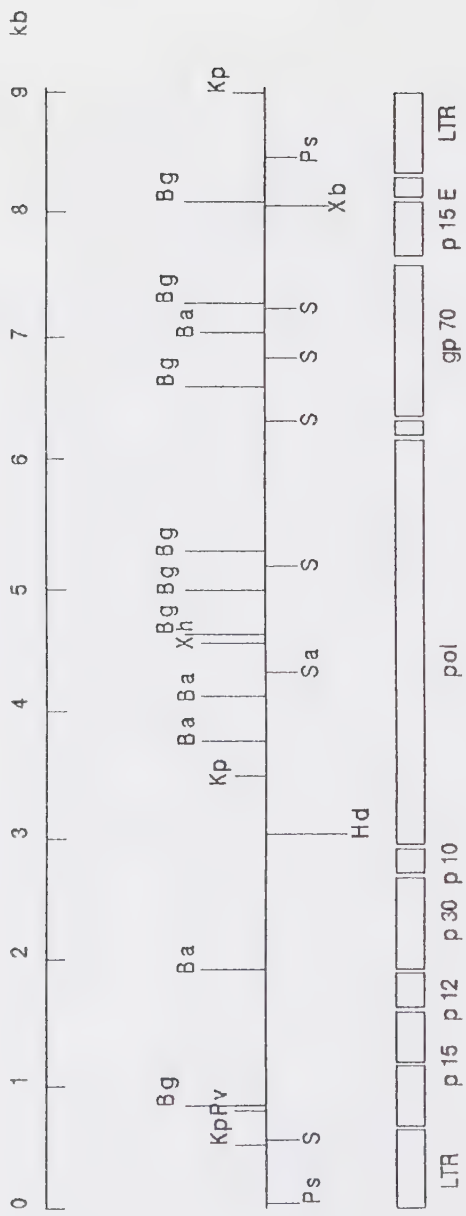


Abb. 18 Restriktionsenzymkarte des RFB-Provirusgenoms.
(Darstellung der Proteine entnommen aus Leib-Mösch, 1986)

Ba: Bam HI; Bg: Bgl II; Hd: Hind III; Kp: Kpn I; Ps: Pst I; Pv: Pvu I; S: Sma I;
Sa: Sal I; Xb: Xba I

Die klonierten Proviren entsprechen demnach einem Virustyp, der an unterschiedlichen Stellen im Genom integriert hatte. Dieses Ergebnis wurde auch durch die RNase T₁ - Fingerprintanalyse bestätigt, in welcher jeweils eine homogene Viruspopulation zu erkennen war.

Das Restriktionsenzymmuster war bis auf eine Ausnahme identisch mit demjenigen von Akv MuLV. Eine Kpn I-Stelle, welche bei Akv MuLV in der gp70 Region des env-Gens lokalisiert ist, fehlte jedoch im RFB-Provirus.

Die physikalische Karte von RFB MuLV zeigt damit ebenso wie die RNase T₁ - Fingerprintanalyse eine hohe Verwandtschaft zum endogenen ecotropen Provirus der AKR-Maus, dem Akv MuLV.

3. 3. Sequenzanalyse der RFB-LTR

Die Restriktionsenzymkartierung sowie die RNase T₁ - Fingerprintanalyse von RFB MuLV und der Vergleich dieser Daten mit denen von Akv MuLV zeigten nur wenige Veränderungen im RFB-Genom. Das Auflösungsvermögen der Fingerprintanalyse und der physikalischen Kartierung mit Restriktionsenzymen ist zur Bestimmung weiterer Merkmale, die für das jeweilige Isolat charakteristisch sind, zu ungenau. Deshalb wurde mit einer spezifischeren Untersuchungsmethode, der DNA-Sequenzanalyse, ein Teil des viralen Genoms, die Kontroll- und Regulationsregion von RFB MuLV, näher charakterisiert.

Diese Region ist bei Retroviren in den LTR-Elementen lokalisiert, welche das Genom am 5'- und am 3'- Ende flankieren. Verschiedene Arbeiten zeigten, daß in diesem Bereich die Zellspezifität vieler muriner Leukämieviren determiniert wird (Rosen, 1985; DesGroseillers, 1984 a). Dies bedingt gleichzeitig eine Spezifizierung der pathologischen Eigenschaften des Virus (DesGroseillers, 1984 b; Li, 1987). Im folgenden wurden deshalb die LTR-Elemente von RFB MuLV isoliert und ihre Nukleotidsequenz bestimmt.

Die klonierten Proviren entsprechen demnach einem Virustyp, der an unterschiedlichen Stellen im Genom integriert hatte. Dieses Ergebnis wurde auch durch die RNase T₁ - Fingerprintanalyse bestätigt, in welcher jeweils eine homogene Viruspopulation zu erkennen war.

Das Restriktionsenzymmuster war bis auf eine Ausnahme identisch mit demjenigen von Akv MuLV. Eine Kpn I-Stelle, welche bei Akv MuLV in der gp70 Region des env-Gens lokalisiert ist, fehlte jedoch im RFB-Provirus.

Die physikalische Karte von RFB MuLV zeigt damit ebenso wie die RNase T₁ - Fingerprintanalyse eine nahe Verwandtschaft zum endogenen ecotropen Provirus der AKR-Maus, dem Akv MuLV.

3. 3. Sequenzanalyse der RFB-LTR

Die Restriktionsenzymkartierung sowie die RNase T₁ - Fingerprintanalyse von RFB MuLV und der Vergleich dieser Daten mit denen von Akv MuLV zeigten nur wenige Veränderungen im RFB-Genom. Das Auflösungsvermögen der Fingerprintanalyse und der physikalischen Kartierung mit Restriktionsenzymen ist zur Bestimmung weiterer Merkmale, die für das jeweilige Isolat charakteristisch sind, zu ungenau. Deshalb wurde mit einer spezifischeren Untersuchungsmethode, der DNA-Sequenzanalyse, ein Teil des viralen Genoms, die Kontroll- und Regulationsregion von RFB MuLV, näher charakterisiert.

Diese Region ist bei Retroviren in den LTR-Elementen lokalisiert, welche das Genom am 5'- und am 3'- Ende flankieren. Verschiedene Arbeiten zeigten, daß in diesem Bereich die Zellspezifität vieler muriner Leukämieviren determiniert wird (Rosen, 1985; DesGroseillers, 1984 a). Dies bedingt gleichzeitig eine Spezifizierung der pathologischen Eigenschaften des Virus (DesGroseillers, 1984 b; Li, 1987). Im folgenden wurden deshalb die LTR-Elemente von RFB MuLV isoliert und ihre Nukleotidsequenz bestimmt.

Die RFB-LTRs wurden aus den λ Klonen RFB/1 $\times$ 1 und MBK 6 isoliert und in den Plasmidvektor pUC 9 subkloniert. Die LTRs sind in den Bgl II - Randfragmenten lokalisiert (Abb. 18) und enthalten sowohl provirale als auch zelluläre Sequenzen. Die einzelnen Bgl II - Fragmente mit den LTRs haben bei MBK 1 eine Länge von 1.9 kb (5' - LTR) bzw. 3.2 kb (3' - LTR) und bei MBK 6 von 6.2 kb (5' - LTR) bzw. 3.3 kb (3' - LTR).

Da der Vektor pUC 9 keine Bgl II-Schnittstelle im Poly-linker enthält, wurde das Plasmid mit Bam HI linearisiert; beide Enzyme besitzen zwar verschiedene Erkennungssequenzen, die nach dem Endonukleaseschnitt resultierenden überstehenden Enden sind jedoch identisch (Abb. 19). Die LTR-Fragmente wurden mit dem Bam HI linearisierten Vektor pUC 9 ligiert und nach der Transformation von kompetenten JM 83 Zellen die positiven Klone durch das X-Gal-System selektiert. Durch einen Schnellaufschluß nach Birnboim konnten die Insertionen verifiziert werden.

Die DNA-Sequenzierung erfolgte nach der Dideoxy-Methode von Sanger direkt aus dem Plasmid. Zum Start der Polymerasereaktion benötigt das Klenow-Enzym ein Primerfragment von 10 - 20 Oligonukleotiden. Da die LTRs muriner Leukämieviren einen hohen Grad an Sequenzhomologien aufweisen (Temin 1981), konnten als Primer synthetische Oligonukleotide eingesetzt werden, die spezifischen Abschnitten der Akv-LTR komplementär sind. Die Anordnung der fünf Primer (ihre Position ist in Abb. 20 angegeben) ermöglichte es, die jeweiligen Abschnitte überlappend zu lesen; somit konnte die komplette Nukleotidsequenz der 5'-LTRs erhalten werden. Primer Nr. 5 (Pos. 616 - 626) liegt 3' außerhalb der U5-Region im Bereich der t-RNA Primer-Bindungsstelle. Aus diesem Grund sind ausschließlich auf den Bgl II - Fragmenten mit den 5'-LTR's komplementäre Sequenzen zu diesem Primer vorhanden.

Dieses System konnte auch auf die RFB-LTR übernommen werden. Es zeigte sich, daß im Vergleich zur Akv-LTR das Segment A in der RFB-LTR nur einmal repräsentiert war, während sich eine zusätzliche Kopie von Segment D zwischen die Abschnitte A und B fügte. Die Grenzen der einzelnen Segmente wurden bei den Rearrangements präzise eingehalten. So konnte in keinem Fall die Insertion eines Segmentes in ein anderes beobachtet werden.

Das Segment D enthält eine Transition von C nach T (Nukleotid Nr. 157). Diese wiederholt sich in den weiteren zwei Kopien dieses Abschnittes in der RFB-LTR. Segment B enthält ebenfalls eine Transition von C nach T (Nukleotid Nr. 181), die sich in der zweiten Kopie dieses Elementes wiederholt.

Die Repeatstruktur in der U3-Region muriner Leukämieviren enthält Enhancerelemente, die wichtige Determinanten für die Leukämogenität dieser Viren darstellen (Lenz, 1984; DesGroseillers, 1984 b). Die Rearrangements und Punktmutationen in der U3-Region von RFB MuLV im Vergleich zu Akv MuLV könnten damit von Bedeutung sein für die Onkogenität dieses Isolates und die Ausprägung des gewebespezifischen Phänotyps.

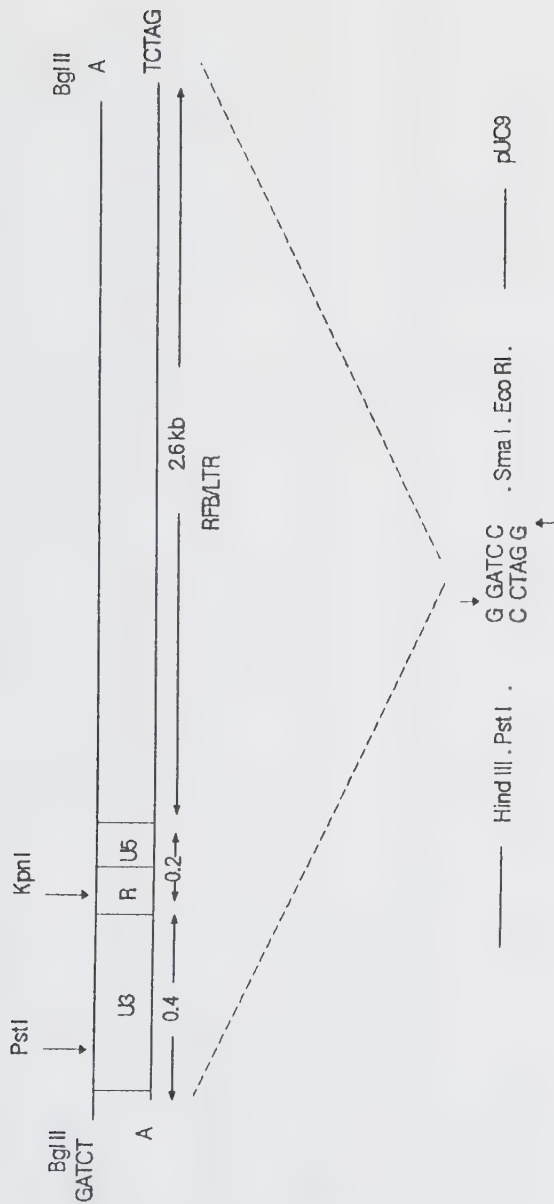


Abb. 19 Schematische Darstellung der Klonierung der RFB/MBK I - 3' LTR in den Plasmidvektor pUC 9.



Abb. 20 Nukleotidsequenz der RFB - LTR und Position der Oligonukleotidprimer
 Primer Nr. 5 (Pos. 612 626) hat die Sequenz CCCCCAGACAGGCC.

* Transition von C nach T

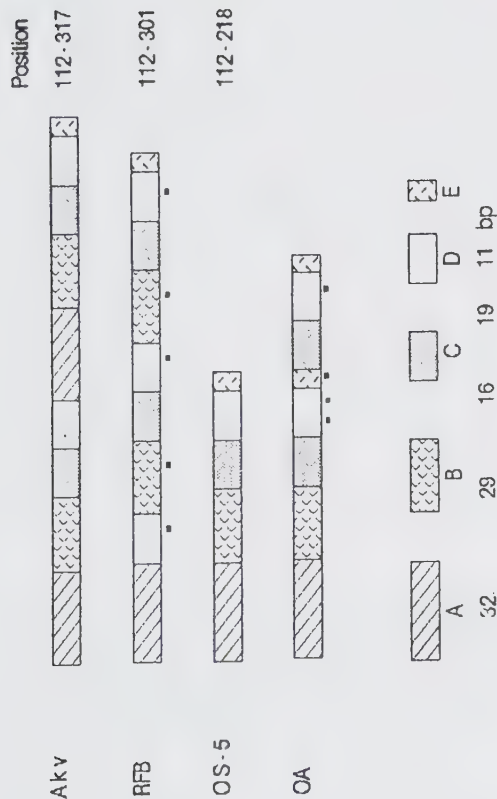


Abb. 21 Schematische Darstellung des Vergleichs von Enhancerregionen im U3-Bereich muriner, osteotroper Leukämieviren (adaptiert nach Pedersen, 1987).

Punktmutationen

4. Das murine Leukämievirus OS-5

4. 1. Molekulare Klonierung des OS-5 - Provirusgenoms

Die Strategie zur Untersuchung von OS-5 MuLV entsprach der Vorgehensweise bei der Klonierung von RFB MuLV.

Die Zelllinie NIH/OS-5 wurde biologisch geklont und die Zellen von Klon 10 (im folgenden NIH/OS-5 C10) für die weiteren Versuche als Ausgangsmaterial benützt. Aus der Zelllinie NIH/OS-5 C10 wurde hochmolekulare DNA isoliert und mit Eco RI geschnitten. Die Hybridisierung mit der ecospezifischen Probe zeigte fünf Banden unterschiedlicher Intensität von 21, 19, 15 - 13.5, 11.5 - 10.5 und 9.8 kb (Abb. 22). Die Banden bei 15 - 13.5 kb und 11.5 - 10.5 kb sind wahrscheinlich mehreren Integrationsorten zuzuordnen, die nach Eco RI-Verdau Fragmente ähnlicher Größe ergeben und deshalb eine breitere und intensivere Schwärzung zeigten. Die Banden bei 21, 19 und 9.8 kb scheinen jeweils der Integration eines einzigen Provirusgenoms zu entsprechen.

Aus der Zelllinie NIH/OS-5 C10 wurden die OS-5 - Provirusintegrationen molekular kloniert. Die isolierte DNA wurde mit Eco RI geschnitten und die Banden zwischen 23 - 16 kb (Fraktion I, enthält die Integrationsorte bei 21 kb und 18 kb) und zwischen 16 - 8 kb (Fraktion II, enthält die Integrationsorte bei 15 - 13.5 kb, 11.5 - 10.5 kb und 9.8 kb) selektiv angereichert. Die Fragmente der Fraktion I wurden in den λ -Vektor Charon 4a, die Fragmente kleiner als 16 kb (Fraktion II) in λ gt wes. λ B kloniert. Dieser Phage ist wie Charon 4a ein Substitutionsvektor, besitzt aber den Vorteil, bei der Phagenvermehrung höhere Titer zu erreichen (Maniatis, 1982). Da seine Kapazität jedoch nur zwischen 2.2 und 15.1 kb liegt, konnte er nur für die Klonierung der Fragmente in Fraktion I Verwendung finden.

Nach der Klonierung konnten in Fraktion I aus 3×10^5 Plaques drei positive Klone, in Fraktion II aus 4×10^5 Plaques achtzehn positive Klone identifiziert werden. Die unterschiedliche Zahl an positiven Klonen ist dadurch zu erklären, daß Ansatz I nur zwei Provirusintegrationsstellen enthielt, Ansatz II jedoch mindestens drei; außerdem verläuft die Klonierung von Fragmenten größer als 19 kb in Charon 4a - Vektoren wenig effizient.

Die λ Klone wurden durch einen Eco RI-Verdau und Hybridisierung mit der für ecotrope Viren spezifischen Probe analysiert. Die OS-5 C10 - Provirusintegrationsorte waren durchschnittlich 3 - 4 x durch die einzelnen Klone repräsentiert. Abb. 23 zeigt die Zuordnung der geklonten Fragmente zu den Proviren der NIH/OS-5 C10 - Zelllinie. Durch Klon 5 war die 18 kb Bande repräsentiert. Klon 13 enthält ein Insert von 13.5 kb und läßt sich der Provirusbande zwischen 15 - 13.5 kb zuordnen. Klon 12 mit 11.5 kb bzw. Klon 11 mit 10.5 kb lassen sich der Provirus-Doppelbande zwischen 11.5 - 10.5 kb zuordnen. Klon 7 repräsentiert die Provirusintegration bei 9.8 kb. Die Provirusintegrationen bei 21 kb bzw. bei 15 kb konnten nicht kloniert werden. Beide Fragmente liegen an der oberen Kapazitätsgrenze der Vektoren λ Charon 4a bzw.

λ gt wes. λ B. Sie werden deshalb nur selten akzeptiert und die Rekombinantanten sind meist sehr instabil (Maniatis, 1982).

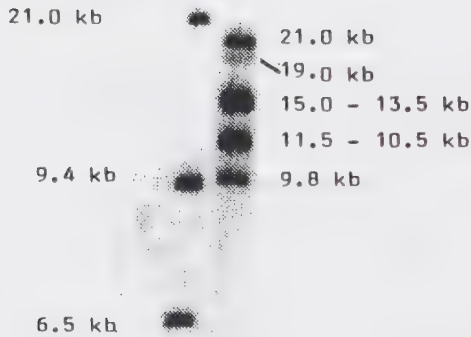


Abb. 22 Integrationsmuster ecotroper Proviren (Eco RI - Verdau) in der NIH/OS-5 C10 - Zelllinie.

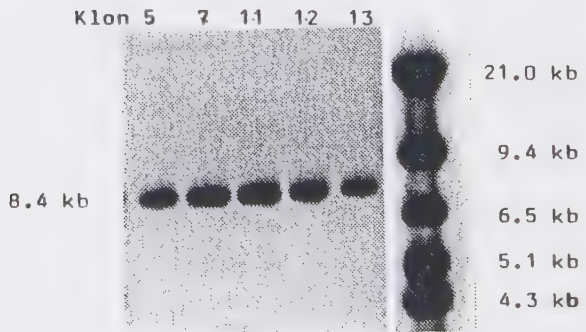


Abb. 24 Pst I - Verdau der OS-5 C10 DNA aus λ Klonen und anschließende Hybridisierung mit der ecotrop-spezifischen Probe.

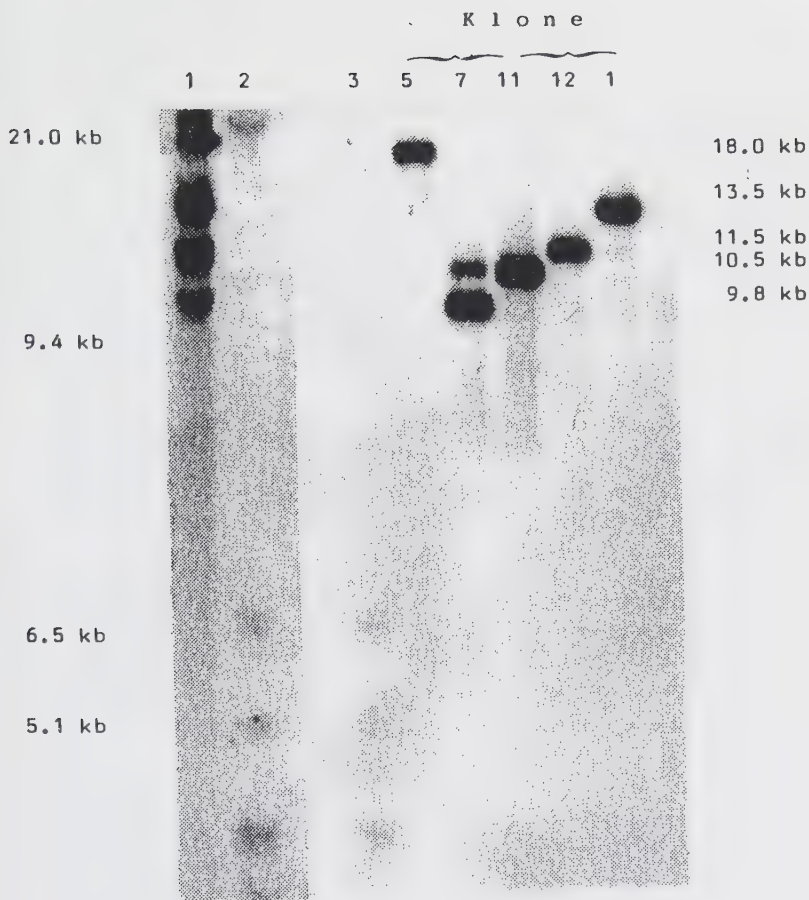


Abb. 23 Zuordnung der λ OS-5 C10 - Klone (Eco RI - Verdau) zu den Integrationsorten ecotroper Proviren in der NIH/OS-5 C10 - Zelllinie.
1) Integrationsmuster ecotroper Proviren der NIH/OS-5 C10 - DNA (Eco RI - Verdau).
2 + 3) Längenstandard

Die Bande, die bei Klon 7 schwach hybridisiert und mit der Insertion von Klon 11 komigriert, ist auf eine Kontamination mit K 11 zurückzuführen und wurde nochmals über Einzelplaqueausstrich gereinigt.

4. 2. Physikalische Kartierung der klonierten OS-5 - Provirusgenome

Eine physikalische Karte der molekularen OS-5 C10 - Klone 5, 7, 11, 12 und 13 wurde auf der Grundlage von Analysen mit den Restriktionsenzymen Bam HI, Bgl II, Eco RI, Hind III, Kpn I, Sal I, Pst I, Pvu II, Xba I und Xho I erstellt. Zur Hybridisierung wurden die gleichen Proben wie in Kap. 2. 2. benützt und die Ergebnisse, wie dort beschrieben, ausgewertet.

Der Pst I - Verdau der DNA aller fünf λ -Klone ergab eine einzige Bande bei 8.4 kb (Abb. 24). Es handelt sich bei den klonierten Proviren der NIH/OS-5 C10 - Zelllinie demnach um komplette retrovirale Genome ohne erkennbare Deletionen.

Die Restriktionsenzymkarten der fünf klonierten OS-5 C10 - Provirusgenome (Abb. 25), basierend auf der Kartierung der Schnittstellen von 10 Restriktionsenzymen, sind gleich. Die Anordnung der Schnittstellen ist weiterhin identisch mit der von Akv MuLV und (mit Ausnahme der Kpn I-Schnittstelle im env-Gen) mit der von RFB MuLV.

Von den molekularen OS-5 C10 - Klonen 12 und 13 wurden außerdem RNase T₁ - Fingerprintanalysen durchgeführt. Diese Fingerprints waren untereinander gleich und identisch mit denen des OS-5/EP MuLV (Fingerprints hier nicht gezeigt).

Diese Daten zeigen die nahe Verwandtschaft von OS-5-, RFB- und Akv MuLV.

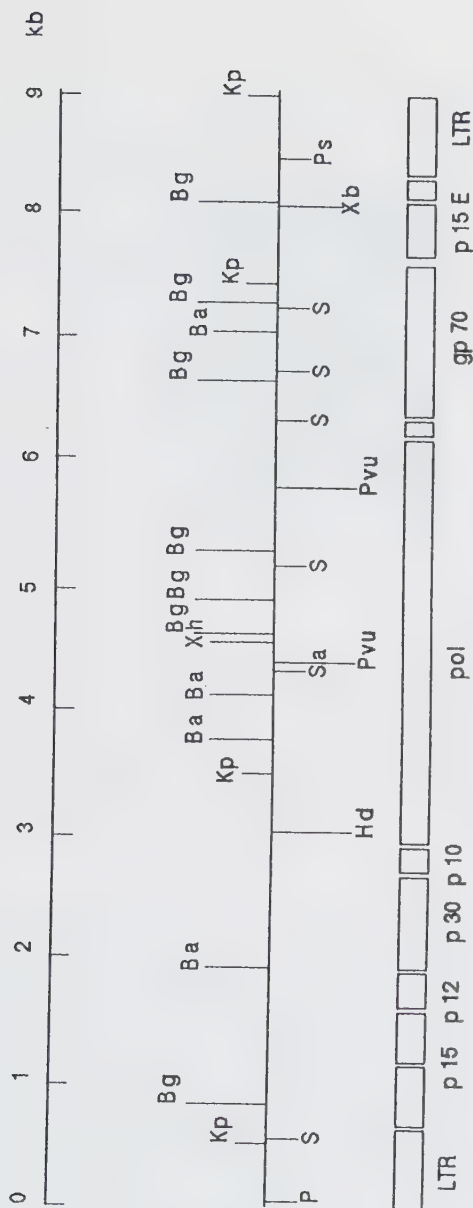


Abb. 25 Restriktionsenzymkarte des OS-5 - Provirusgenoms.

(Darstellung der Proteine entnommen aus Leib-Mösch, 1986)

Ba: Bam HI; Bg: Bgl II; Hd: Hind III; Kp: Kpn I; Ps: Pst I; Pv: Pvu I; S: Sma I;
Sa: Sal I; Xh: Xho I

4. 3. Sequenzanalyse der OS-5 - LTR

Da bei der Untersuchung der LTR-Sequenz von RFB MuLV interessante Veränderungen zu Akv MuLV in diesem Bereich der U3-Region gefunden wurden, sollten die OS-5 - LTRs ebenfalls sequenziert werden.

Die OS-5 LTRs wurden aus den λ OS-5 C10 - Klonen isoliert und zur Sequenzierung in den Phagenvektor M13mpl8 subkloniert.

DNA der λ -Klone 5, 11 und 12 wurde mit Bgl II, die der Klone 7 und 13 mit Eco RI und Bgl II geschnitten und die LTR-enthaltenden Fragmente durch Hybridisierung mit der LTR-spezifischen Probe identifiziert (Abb. 26). Da die Sequenz der 5'- und 3'-LTRs retroviraler Proviren identisch ist (Varmus, 1982), wurde nur jeweils ein LTR-Fragment (in Abb. 26 durch einen Pfeil gekennzeichnet) für die Sequenzierung ausgewählt.

Die Bgl II - Fragmente der Klone 5, 11 und 12 wurden in die Bam HI, die der Klone 7 und 13 in die Eco RI-/Bam HI - Schnittstellen des Phagenvektors M13mpl8 kloniert. Abb. 27 zeigt dies am Beispiel der Klonierung der OS-5 C10/K7 - LTR. Die rekombinanten Klone konnten mit dem X-Gal - System selektiert und durch eine Restriktionsenzymanalyse verifiziert werden.

Die LTR-Nukleotidsequenz der OS-5 C10 Proviren wurde mit der Dideoxymethode nach Sanger im M13-System bestimmt. Der Universalprimer (17mer, Abb. 27), der am 3'-Ende des Polylinkers bindet, war Startpunkt für die Synthese des komplementären Stranges. Da nur max. 250 bp pro Startpunkt identifiziert werden konnten, wurde das Insert schrittweise um ca. 200 bp verkürzt. Zur Erzeugung gerichteter Deletionen im Insert kamen die folgenden zwei Strategien zur Anwendung.

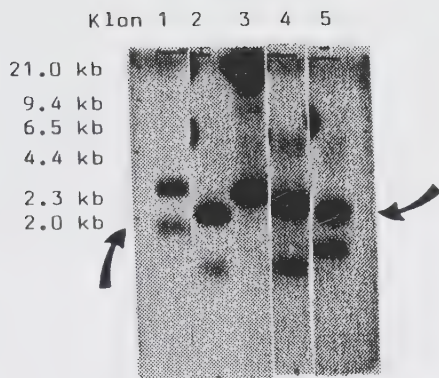


Abb. 26 Identifizierung von LTR-Fragmenten der OS-5 C10 λ Klone mit der LTR-spezifischen Probe. Die mit einem Pfeil gekennzeichneten Fragmente wurden für die Klonierung ausgewählt.

- 1) K5 / Bgl II
- 2) K7 / Bgl II/Eco RI
- 3) K11 / Bgl II
- 4) K12 / Bgl II
- 5) K13 / Bgl II/Eco RI

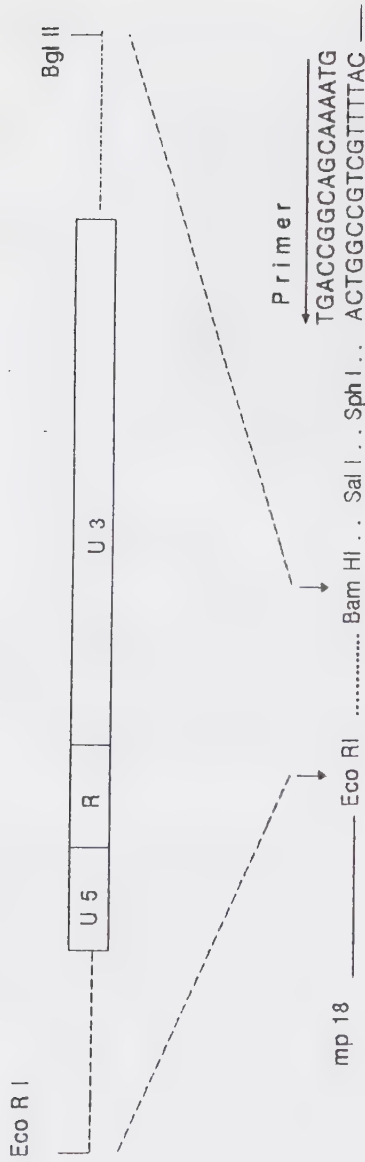


Abb. 27 Subklonierung des Bgl II/Eco RI - LTR-Fragmentes von OS-5 ClO/K7 in den Phagenvektor mp18.

Die von Henikoff (1984) beschriebene Methode basiert auf einem Exonuklease III/bl-Nuklease-Verdau zur Erzeugung unidirektionaler Deletionen im Insert, ohne die Primer-Bindungsstelle zu zerstören. Exonuklease III startet bevorzugt an DNA mit 3'- zurückversetzten oder stumpfen Enden und verdaut sukzessive den Einzelstrang in 3' - 5' Richtung; überstehende 3'- Enden bilden kein Substrat für dieses Enzym. Der komplementäre Strang bleibt unangetastet und kann durch S1-Nuklease verdaut werden. Überstehende Enden werden mit dem Klenow-Enzym aufgefüllt und der Vektor mit dem Insert religiert (Abb. 3). mpl8-K7-, K12- und K13-DNA wurden mit Sph I (GCATG C) und Sal I (G TCGAC) geschnitten (Abb. 27); beide Enzyme besitzen jeweils eine singuläre Erkennungsstelle im Poly-linker von mpl8 und schneiden nicht im Insert. Das Insert konnte somit durch Exonuklease III kontinuierlich verkürzt werden, während die Primer-Bindungsstelle durch das 3'-überstehende Ende der SphI-Schnittstelle geschützt war. Das weitere Vorgehen ist in Kap. B IV/7. 1. 1. 1. beschrieben.

Bei der von Poncz (1982) beschriebenen Methode (Bal 31 - Verdau) wird die zirkuläre M13-DNA durch ein Restriktionsenzym mit singulärer Erkennungssequenz zwischen dem Insert und der Primer-Bindungsstelle linearisiert (Abb. 5). Bal 31 startet dann unspezifisch an beiden Strangenden, d. h. sowohl das Insert als auch der Vektor werden schrittweise verkürzt. Um wieder ein komplettes, replikationsfähiges Virusgenom zu erhalten, muß das Insert an seinem 5'-Ende herausgeschnitten werden; dieses Fragment wird aus dem Agarosegel isoliert und in einen intakten M13-Vektor rekloniert. Der Vektor wird hierzu mit zwei Enzymen geschnitten, von denen eines stumpfe Enden, das andere überstehende Enden erzeugt. Die Schnittstellen müssen dabei so lokalisiert sein, daß das von Bal 31

erzeugte stumpfe Ende nächst der Primer-Bindungsstelle liegt. Durch diese gerichtete Insertion wird eine lineare Abfolge der Sequenzierung durch die Kombination verschiedener Klone gewährleistet.

mpl8-K5 und K11 DNA wurden hierzu mit Sal I linearisiert (Abb. 27). Nach Verdau mit Bal 31 wurde die DNA mit Eco RI nachgeschnitten, um die verkürzten Inserts vom Restvektor abzutrennen. Die Inserts wurden isoliert, in die Eco RI/Sma I - Schnittstelle von mpl8 kloniert und in die Sequenzierung eingesetzt. Der Ablauf der einzelnen Reaktionen ist in Kap. B IV/7. 1. 1. 2 beschrieben.

Unter Verwendung des Universalprimers in Kombination mit den Deletionsmutanten wurde die LTR-Sequenz der fünf klonierten OS-5 C10 - Provirusgenome ermittelt (Abb. 28). Die LTR-Sequenzen der Klone 5, 7, 11, 12 und 13 sind untereinander identisch. Dies stützt die Interpretation, daß im OS-5 C10 - Isolat nur ein ecotroper Retrovirustyp vorliegt, der an mehreren Stellen im Genom integriert hatte.

In der U3-Region ist im Vergleich zur Akv-LTR in Position 372 eine Transition von C nach T, in der U5-Region eine Transition von G nach A in Position 510 zu finden. In der U3-Region ist außerdem eine Sequenz von 99 bp deletiert, die im Bereich des viralen Enhancers liegt. Eine schematische Darstellung dieser Deletion zeigt Abb. 21. Man erkennt, daß der Tandemrepeat von Akv MuLV bei OS-5 MuLV in nur einer Kopie vorhanden ist. Innerhalb dieses Repeats sind keine weiteren Rearrangements zu finden. Die Anordnung der Elemente A - E entspricht damit der von Akv MuLV.

In Analogie zu RFB MuLV zeigte damit OS-5 MuLV interessante Veränderungen in der U3-Region der LTRs. Die ausgedehnte Deletion im Repeatbereich könnte von Bedeutung sein für die Aktivität des hier lokalisierten Enhancers.

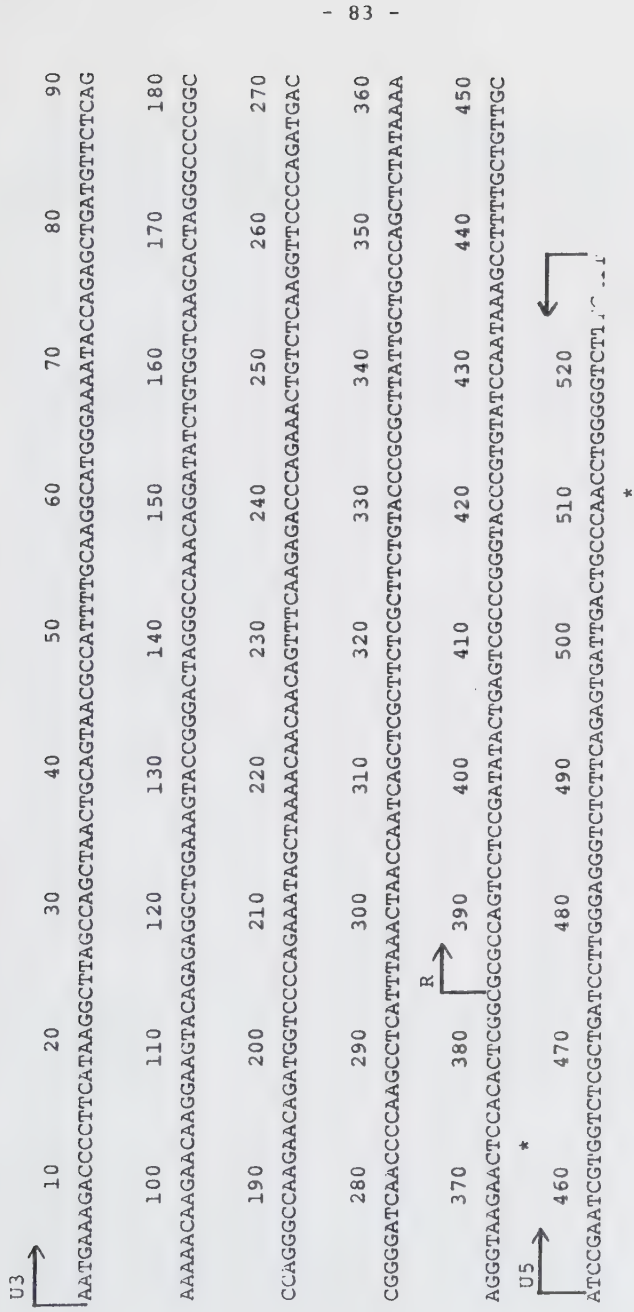


Abb. 28 Nukleotidsequenz der OS-5 - LTR.

* Transition von C nach T (Pos. 372) bzw. von G nach A (Pos. 510).

5. Biologische Aktivität der RFB- und OS-5 - λ Klone

Während der Klonierung, zu der viele einzelne Schritte notwendig sind, können im Virusgenom *in vitro* Mutationen, Deletionen usw. verursacht werden. Außerdem können sich durch wiederholte Passagen, wie sie z. B. bei der Klonung von Zelllinien stattfinden, durch Selektion die biologischen Eigenschaften der ursprünglichen Isolate verändern. Aus diesem Grund ist der *in vivo*-Nachweis der Onkogenität klonierter Retroviren ein entscheidender Beweis für die Richtigkeit der Analysen.

Die murinen Leukämieviren aus den zellulären Klonen von NIH/OS-5 und NIH/RFB, NIH/OS-5 C10 bzw. NIH/RFB-K7 sowie die aus diesen Zelllinien isolierten molekularen Klone wurden deshalb in NMRI-Mäusen auf ihre biologischen Eigenschaften getestet (Tabelle 2).

Vergleicht man die biologische Aktivität von OS-5 MuLV und OS-5 C10 MuLV miteinander, so bemerkt man eine drastische Steigerung der Latenzzeit um mehr als 150 Tage. Gleichzeitig erniedrigte sich die Häufigkeit von Knochenveränderungen. RFB MuLV aus dem zellulären Klon 7 zeigte ebenfalls eine erhöhte Latenzzeit bis zur Erkrankung, jedoch gleichzeitig eine Zunahme an Osteomen um 40 %. Vergleicht man diese Ergebnisse mit denen von OA MuLV und Akv MuLV, bestätigt dies den Ausgangspunkt der Untersuchungen in Kapitel 1. OS-5 C10 MuLV war dasjenige Isolat, welches die geringste biologische Aktivität in NMRI-Mäusen zeigte, während RFB/K7 MuLV mit einer hohen Inzidenz und einer relativ geringen Latenzzeit sowohl Lymphome als auch Osteopetrose und Osteome induzierte.

Um die *in vivo*-Aktivität der molekular klonierten RFB- und OS-5 - Viren zu testen, mußte zuerst replikationsfähiges Virus isoliert werden. Hierzu wurden die λ -Klone RFB/K1 und K6 sowie die OS-5 C10 - Klone K5, 7, 11, 12 und 13 in NIH 3T3 - Zellen transfiziert und nach einer Woche in der

Immunperoxidasefärbung auf die Expression des viralen p30 Proteins getestet. Waren alle Zellen p30 positiv, wurde der Überstand erneut in NIH 3T3-Zellen auf die Freisetzung von infektiösen, viralen Partikeln untersucht.

Von den fünf isolierten Provirusgenomen der OS-5 Cl0 - Zelllinie konnten nur aus den drei λ -Klonen 5, 12 und 13 nach Transfektion in NIH 3T3-Zellen infektiöses Virus gewonnen werden. Die Klone 7 und 11 ergaben reproduzierbar kein replikationsfähiges Virus. Zwar waren einige Zellen in der IPF-Färbung stets positiv, eine Ausbreitung der Infektion auf benachbarte Zellen fand jedoch nicht statt. Da weder bei den Restriktionsenzymkarten noch den LTR-Sequenzen Unterschiede zu den Klonen 5, 12 und 13 zu erkennen waren, scheinen diese Integrationsorte durch Mikrodeletionen oder Mutationen inaktiviert zu sein. Die molekularen Klone 5 und 12 waren in ihrer biologischen Aktivität ähnlich der des Zellklons OS-5 Cl0, welcher als Basis für die molekulare Klonierung diente. Das Virus von Klon 13 zeigte jedoch überraschenderweise eine Osteopetroseinzidenz von 100 % und eine Osteomrate von 63 %. Klon 13 gleicht damit in seinen biologischen Eigenschaften denen von RFB MuLV. Weitere in vivo Experimente müssen dieses Ergebnis verifizieren.

Die Daten aus den Experimenten mit den molekularen Klonen von RFB MuLV liegen noch nicht vor. Röntgenkontrolluntersuchungen zeigten jedoch das Entstehen multipler Osteome und Osteopetrose in allen infizierten NMRI-Mäusen.

<u>Virustyp</u>	<u>Malignes Lymphom</u>		<u>Osteopetrose</u>		<u>Osteom</u>	
Kontrollen ⁺	0/5 *	547 **	0/5	547	0/5	547
RFB/K7	8/9 (89 %)	293 ± 54	9/9 (100 %)	302 ± 57	7/9 (78 %)	313 ± 53
OS-5 Cl0	7/8 (87 %)	492 ± 83	2/8 (25 %)	503 ± 70	1/8 (13 %)	553
OS-5 Cl0/K5	9/10 (90 %)	437 ± 170	1/10 (10 %)	553	1/10 (10 %)	553
OS-5 Cl0/K12	7/8 (88 %)	467 ± 130	0/8		2/8 (25 %)	506 ± 8
OS-5 Cl0/K13	7/8 (88 %)	408 ± 49	8/8 (100 %)	382 ± 62	5/8 (63 %)	408 ± 49

Tabelle 2

Pathogenität zellfreier Extrakte von virusproduzierenden NIH 3T3 - Zelllinien

* Zahl erkrankter Tiere / Zahl infizierter Tiere

** mittlere Latenzzeit

+ NMRI-Kontrolltiere, injiziert mit zellfreiem Überstand von NIH 3T3 - Zellen

6. Analyse der Aktivität viraler Transkriptions- kontrollelemente im "CAT-Assay"

Die folgenden Experimente konzentrierten sich auf die Bedeutung der U3-Region der viralen LTRs für die Regulation der Transkription.

Die U3-Region zeigte bei den murinen Leukämieviren RFB, OS-5, OA und Akv vielfache Variationen in der Anordnung einzelner Segmente, in welchem Enhancerelemente lokalisiert sind (Abb. 21). Enhancer sind positive regulatorische Elemente, die relativ unabhängig von ihrer Entfernung die Aktivität viraler und zellulärer Gene steuern können. Zusätzlich zum Enhancer umfaßt die Kontrollregion der Transkription noch den Promotor und die "Promotor-upstream" liegenden Sequenzen (Serfling, 1985). Durch die Bindung zellspezifischer Proteinfaktoren an diese cis-genetischen Sequenzen kann die Zelle den Zeitpunkt, die Dauer und die Höhe der Genexpression regulieren (Maniatis, 1987).

Die Promotor- und Enhancersequenzen sind lokalisiert zwischen der Pst I - (U3-Region) und Kpn I - Schnittstelle (R-Region) der viralen LTRs. Der Einfluß dieser Kontrollregion auf die Transkription kann im sogenannten "CAT-Assay" quantitativ und qualitativ untersucht werden (Gorman, 1982).

Diese Regulationssequenzen (Pst I / Kpn I - Fragment der LTRs) wurden vor ein Indikatorgen inseriert, welches für ein Enzym, die Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT), kodiert. Nach Transfektion des CAT-Plasmids in tierische Zellen konnte die Aktivität des Enzyms durch ein einfaches Testverfahren nachgewiesen werden. Die Menge an gebildetem Enzym ist ein Maß für die Aktivität der untersuchten Promotor- und Enhancersequenzen und korreliert mit der Produktion von mRNA (Laimins, 1982). Da in eukaryontischen Zellen kein CAT-Enzym exprimiert wird, ist das System frei von Hintergrundaktivität (Gorman, 1982).

Die Konstruktion der CAT-Plasmide gliederte sich in vier Abschnitte:

- Isolierung der Pst I - Kpn I-Fragmente der LTR
- Auffüllen der Enden mit T4-DNA-Polymerase
- Ligierung in die Sma I-Stelle von pUC CAT1
- Kartierung zur Selektion der Orientierung

Die LTR-Fragmente (Pst I - Kpn I) von RFB-, OS-5-, OA- und Akv MuLV konnten, wie in Kap. B IV/8 beschrieben, in den Vektor pUC CAT1 eingebaut und ihre Orientierung bestimmt werden. Die Plasmide erhielten die Bezeichnungen CAT1-Akv, -OA, -OS-5 und -RFB.

Für die Transfektion in eukaryontische Zellen ist es notwendig, daß die Plasmid-DNA in der supercoil-Form vorliegt. Zwar sind auch die genickte und die entspannte Konfiguration aktiv, die Expression des CAT-Gens ist jedoch stärker und die Ergebnisse reproduzierbarer, wenn die supercoil-Form transfiziert wird (Weintraub, 1986). Die Plasmide wurden über zwei CsCl-Gradientenzentrifugationen gereinigt und portioniert bei -20°C eingefroren, da durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen die Topologie des Ringes zerstört wird.

Um möglichst vergleichbare Daten zu erhalten, wurden die vier Plasmide parallel in Zellen aus einer Passage transfiziert. In allen Experimenten fand der gleiche HBS-Puffer und Plasmid aus einer Präparation Verwendung.

Die Konversionsraten setzen sich zusammen aus dem Mittelwert von 3 - 4 Experimenten, in denen jeweils vier Kulturen, unabhängig voneinander, transfiziert wurden. Als Bezugsgröße wurde die Konversionsrate durch CAT1-OS-5 gleich 1 gesetzt und die Aktivität der Vergleichsplasmide relativ zur OS-5 - Aktivität berechnet.

6. 1. Aktivität der Regulationssequenzen in NIH 3T3 - Zellen

Zur vergleichenden Untersuchung der Transkriptionsaktivität der Promotor-/Enhancersequenzen wurde die Zelllinie NIH 3T3 ausgewählt. Diese permanente Fibroblastenzelllinie enthält keine endogenen, ecotropen Retroviren (Coffin, 1984), ist aber sensitiv für deren Infektion und Replikation und außerdem noch hervorragend transfizierbar.

Mit dem Plasmid CAT1-OS-5 ergab sich eine durchschnittliche Konversionsrate von 23 % (Abb. 29). Setzt man diesen Wert gleich 1, so war im Vergleich hierzu die Aktivität von Akv um das Dreifache erhöht. RFB lag mit einer Erhöhung um das Zweifache zwischen diesen beiden Extremen, während OA sich nur geringfügig in seiner Aktivität von OS-5 unterschied.

Die CAT-Aktivität war also bei den LTR-Sequenzen der einzelnen Isolate unterschiedlich ausgeprägt. Diese Ergebnisse zeigten damit deutlich die Abhängigkeit der Transkriptionseffizienz von der Struktur der viralen Regulationssequenzen.

Die Enhancerregion der hier untersuchten Retroviren enthält die Hexanukleotid-Konsensussequenz AGAACA (Segment D), die typisch ist für Glucocorticoid-Rezeptor-Bindungsstellen (Payvar, 1983; Scheidereit, 1983). In der OS-5 - LTR ist diese potentielle Hormon-Bindungsstelle in einer Kopie, in der OA- und Akv-LTR in zwei und in der RFB-LTR in drei Kopien jeweils in Segment D repräsentiert. Es sollte im folgenden untersucht werden, ob durch die Zugabe von Hormon die Transkription in Abhängigkeit von den viralen Kontrollelementen beeinflussbar ist.

NIH 3T3 - Zellen wurden mit den CAT-Plasmiden transfiziert, nach dem Glyzerinschock mit Dexamethason (10^{-6}M), einem synthetischen Glucocorticoid, für weitere zwei Tage inkubiert und der CAT-Assay wie beschrieben durchgeführt. Vergleichskulturen blieben nach der Transfektion unbehandelt.

Die absolute CAT-Aktivität erhöhte sich nach Hormoninduktion um einen signifikanten Faktor (Abb. 29). Während bei OS-5, Akv und RFB eine Steigerung der Transkription um das 1.5 fache zu beobachten war, nahm bei OA die Aktivität um das 1.9 fache zu. Die Transkriptionsaktivitäten der vier Plasmide standen nach Glucocorticoidzugabe weiterhin im gleichen Verhältnis zueinander wie ohne Dexamethasoninduktion.

Diese Ergebnisse zeigten, daß Dexamethason in der Lage war, aktivierend auf die Transkription von Genen unter Kontrolle der viralen LTRs einzuwirken.

6. 2. Aktivität der Regulationssequenzen in ROS 17/2.8 - und ROS 25/1 - Zellen

Murine Leukämieviren unterscheiden sich in ihrem onkogenen Potential und in ihrer Spezifität für die Tumorinduktion. Die Analyse von Rekombinanten zwischen solchen Viren ergab, daß eine Hauptkomponente für die Zellspezifität in der U3-Region der LTRs lokalisiert ist (Chatiss, 1983; 1984). An einem osteotropen Retrovirusisolat, OA MuLV, wiesen Schmidt (in Vorb.) und Murray (in Vorb.) eine Präferenz für die Infektion von osteoblastenähnlichen, sich differenzierenden Zellen nach. Im folgenden sollte mit Hilfe des CAT-Assays untersucht werden, ob die Promotor- und Enhancersequenzen mitbestimmend sind an der Ausprägung knochenspezifischer Effekte osteotroper Retroviren.

Für die Experimente wurden die Zelllinien ROS 17/2.8 und ROS 25/1 ausgewählt. Beide Zelllinien waren aus einem Rattenosteosarkom etabliert worden (Majeska, 1980) und zeigten einen unterschiedlichen Differenzierungsstatus (Rodan, 1984).

ROS 17/2.8 - Zellen weisen verschiedene C leoblastencharakteristika auf wie z. B. eine hohe Expression an Alkalischer Phosphatase. ROS 25/1 - Zellen sind dagegen als undifferenzierte Zellen zu betrachten. Unterschiede in der von Promotor- und Enhancersequenzen kontrollierten Transkriptionsaktivität in Abhängigkeit vom Differenzierungsstatus der Zelle könnten weitere Hinweise auf eine Zellspezifität osteotroper Retroviren geben.

Die Aktivität der LTR-Sequenzen war nach Transfektion der CAT-Plasmide in ROS 17/2.8 - Zellen mit 5 % bei CAT1 OS-5 und in gleicher Weise bei den anderen Konstrukten wesentlich geringer als in NIH 3T3 - Zellen mit 23 %. CAT1 RFB zeigte die höchste Aktivität, während bei OS-5 die Aktivität am geringsten war (Abb. 30). OA und RFB liegen mit dem 2 - 2.5 fachen über der Aktivität von OS-5. Das relative Verhältnis der Transkriptionsaktivitäten war damit trotz der geringeren Basalaktivität in ROS 17/2.8 - Zellen das gleiche wie in NIH 3T3 - Zellen. Die Aktivität von CAT1-Akv wurde nicht gemessen.

Durch Zugabe von Dexamethason zu ROS 17/2.8 - Zellen erhöhte sich nach CAT1 OA - Transfektion die CAT-Aktivität um das Dreifache, während bei OS-5 und RFB eine Steigerung um den Faktor zwei zu beobachten war (Abb. 30). Die Transkriptionsaktivität der Regulationssequenzen ist demnach in ROS 17/2.8 - Zellen durch Steroidhormone induzierbar, und zwar wesentlich effizienter als in NIH 3T3 - Zellen.

In ROS 25/1 - Zellen betrug die Konversionsrate nach Transfektion mit CAT1-OS-5 etwa 2 % und lag damit am Rande der Nachweisgrenze. Die Aktivität von CAT1-RFB war etwa doppelt so hoch wie die von OS-5, die von OA lag zwischen beiden Werten (Abb. 31).

Die Zugabe von Dexamethason zu ROS 25/1 - Zellen führte bei keinem der transfizierten CAT-Plasmide zu einer meßbaren Veränderung in der CAT-Aktivität. Dieses Steroidhormon war also nicht in der Lage, regulierend auf die Transkription in dieser Zelllinie einzuwirken.

Vergleicht man die Konversionsraten der CAT-Plasmide in den beiden ROS-Zelllinien, so waren diese in ROS 17/2.8 - Zellen um etwa das 2 - 3 fache höher als in ROS 25/1 - Zellen (Abb. 32). Um auszuschließen, daß diese Unterschiede auf einer verminderten Transfizierbarkeit von ROS 25/1 - Zellen beruhen, wurden beide Zelllinien mit einem Vergleichsplasmid transfiziert. Hierzu wurde das Plasmid pSV2 CAT ausgewählt, in welchem das CAT-Gen unter dem Einfluß der SV40 Promotor- und Enhancersequenzen steht. Die Konversionsrate nach pSV2 CAT - Transfektion war mit 7- 8 % zwar gering, aber in ROS 17/2.8 - und ROS 25/1 - Zellen in etwa vergleichbar stark.

Diese Unterschiede in der CAT-Expression nach Transfektion von CAT1 OS-5, -OA oder -RFB, nämlich hohe Konversionsraten in ROS 17/2.8 - Zellen, niedrige in ROS 25/1 - Zellen, könnten eine zellspezifische Aktivität der LTR-Sequenzen osteotroper Retroviren andeuten.

Die Resultate beruhen jedoch erst auf einem Transfektionsexperiment mit drei Petrischalen und sind deshalb noch nicht hinreichend statistisch abgesichert. Weitere Experimente unter Einbeziehung von sich in Kultur differenzierenden Zelllinien sind nötig, um eine klare Beweisführung zu sichern.

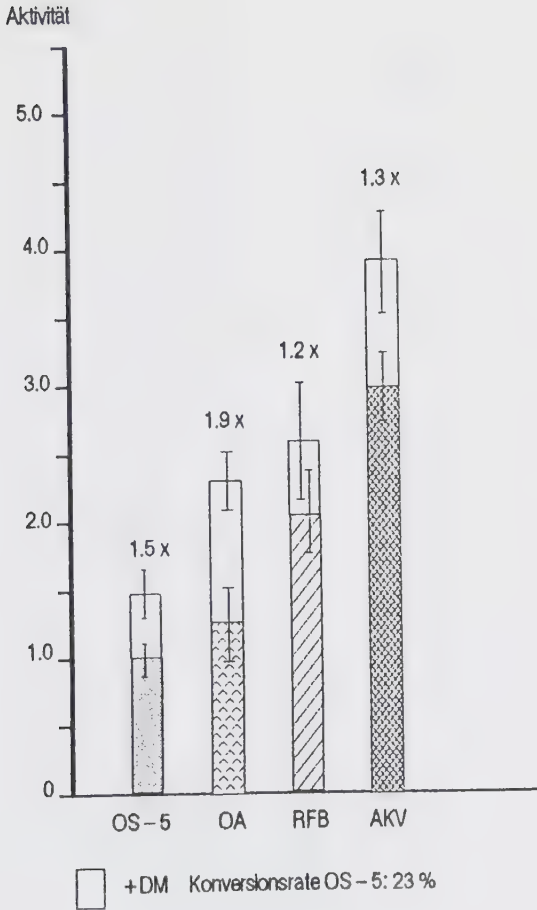


Abb. 29 CAT-Aktivität in NIH 3T3 - Zellen.
Die schraffierten Boxen entsprechen der Aktivität ohne Zugabe von Dexamethason, die weißen Boxen geben die Steigerung der CAT-Expression nach Dexamethasonzugabe wieder.

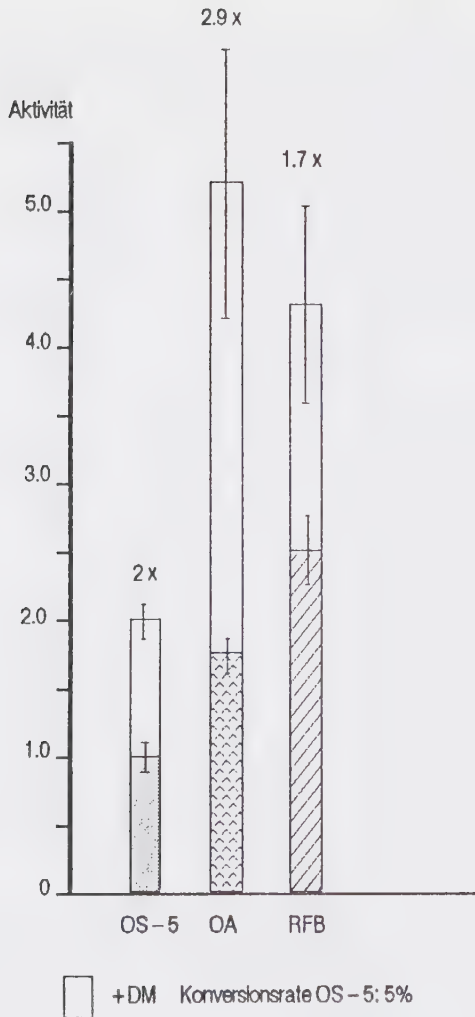


Abb. 30 CAT- Aktivität in ROS 17/2.8 - Zellen.
Die schraffierten Boxen entsprechen der Aktivität ohne Zugabe von Dexamethason, die weißen Boxen geben die Steigerung der CAT-Expression nach Dexamethasonzugabe wieder.

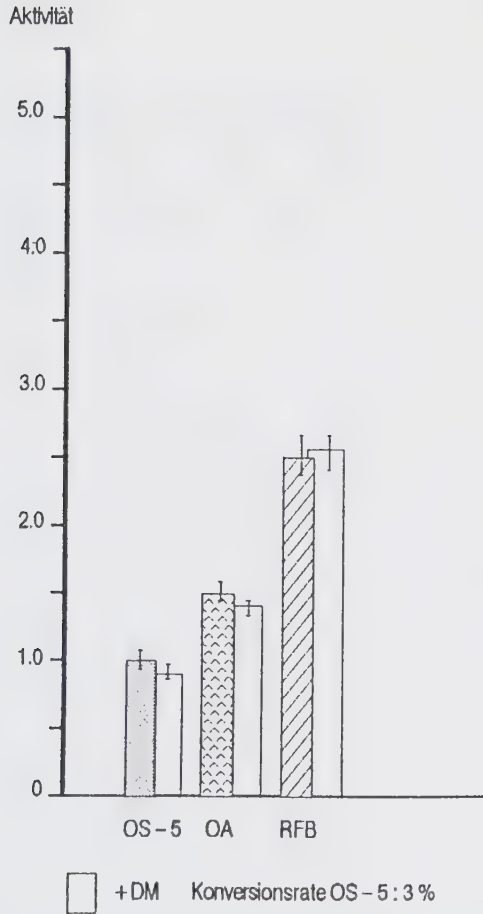


Abb. 31 CAT-Aktivität in ROS 25/1 - Zellen.
Die schraffierten Boxen entsprechen der Aktivität ohne Zugabe von Dexamethason, die weißen Boxen geben die Steigerung der CAT-Expression nach Dexamethasonzugabe wieder.

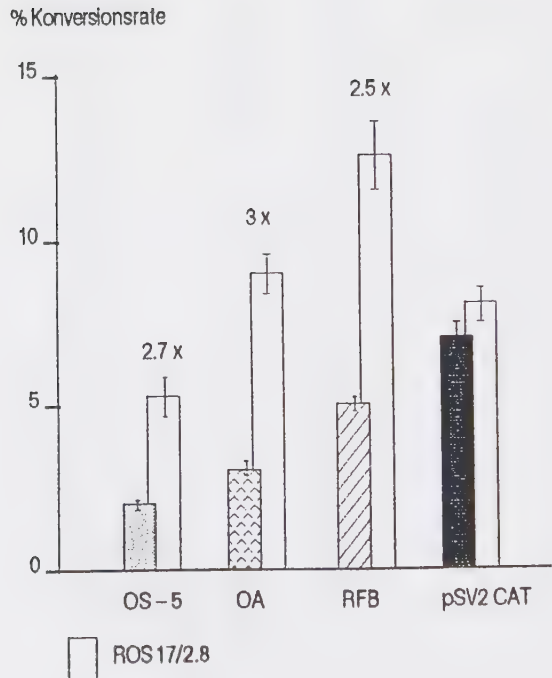


Abb. 32 Vergleich der Konversionsrate in ROS 17/2.8- und ROS 25/1 - Zellen.
Die offenen Boxen entsprechen ROS 17/2.8 - Zellen,
die schraffierten Boxen ROS 25/1 - Zellen

D: D I S K U S S I O N

Die vier Retrovirusisolate OA-, Akv-, RFB- und OS-5 MuLV, welche nach Aktivierung endogener retroviraler Sequenzen aus unterschiedlichen Mäusestämmen isoliert wurden, weisen eine Reihe übereinstimmender Merkmale auf. Es handelt sich um replikationskompetente Retroviren, die nach einer mittleren Latenzzeit von mehr als zehn Monaten in NMRI-Mäusen Lymphome, Osteopetrose und Osteome induzieren. Sie unterscheiden sich damit von einer Reihe weiterer Isolate wie Mo MuLV, Fr MuLV oder Gross A, die nach kürzerer Latenzzeit zwar ebenfalls Erkrankungen des lymphoproliferativen Systems induzieren, jedoch keine knochen-spezifischen Erkrankungen bewirken (Teich, 1984a). OA-, Akv-, RFB- und OS-5 MuLV können deshalb gemeinsam in eine Gruppe lymphotroper und osteotroper Retroviren eingeordnet und von den anderen murinen Leukämieviren abgegrenzt werden.

Auf Grund ihres onkogenen Potentials lassen sie sich weiter differenzieren. So ist RFB MuLV das biologisch aktivste Isolat und induziert multiple Osteome und Lymphome nach einer Latenzzeit von 200 - 300 Tagen. Im Gegensatz dazu zeigen OS-5 MuLV und Akv MuLV eine wesentlich erniedrigte Inzidenz an Knochenveränderungen und eine erhöhte Latenzzeit. OA MuLV nimmt in seiner Pathogenität bei diesen Isolaten eine Mittelstellung ein.

Diese spezifischen Eigenschaften osteotroper Retroviren sollten sich in Veränderungen ihres genetischen Materials widerspiegeln. Durch die molekulare Analyse der noch nicht charakterisierten Isolate RFB MuLV und OS-5 MuLV mit ihrem verschiedenen onkogenen Potential sollten die Unterschiede im Genom dieser Gruppe muriner Retroviren dargestellt werden. Der Vergleich struktureller Daten dieser Isolate

könnte Hinweise liefern, welche Regionen des viralen Genoms an der Ausprägung der biologischen Aktivität osteotroper Retroviren beteiligt sind.

Die molekulare Organisation fast aller dieser Isolate und ihre Beziehung zum endogenen, ecotropen Retrovirus der AKR-Maus, Akv MuLV, war unbekannt. So war ebenfalls fraglich, ob OS-5 MuLV und RFB MuLV aus einer homogenen Viruspopulation oder aus einem Gemisch mehrerer Viren bestehen bzw. ob die hohe Virulenz von RFB MuLV durch ein zusätzliches Onkogen verursacht wird. Lediglich Akv MuLV und OA MuLV waren in ihrer molekularen Struktur näher analysiert (Etzerodt, 1984; Herr, 1984; Leib-Mösch, 1986).

Die RNase T₁-Fingerprintanalyse und die Restriktionsenzymkartierung von RFB- und OS-5 MuLV zeigten die nahe Verwandtschaft dieser Viren untereinander und zu den Isolaten OA- und Akv MuLV. Im Gegensatz zu den schnell transformierenden, osteotropen Sarkomviren FBJ und FBR fehlen RFB- und OS-5 MuLV zusätzliche zelluläre Sequenzen. Vor allem bei RFB MuLV, welches sehr effizient Osteome induziert, war vor diesen Untersuchungen unklar, ob es ein defektes, Onkogen tragendes Virus ist (Teich, 1984a). Es waren aber keine ausgedehnten Deletionen oder Insertionen im Genom erkennbar, die auf zusätzliche zelluläre Sequenzen hindeuteten. Die Fingerprintanalyse beweist außerdem eindeutig, daß RFB MuLV sich aus einer homogenen Viruspopulation zusammensetzt. Typischerweise sind Viren mit Onkogenen charakterisiert durch ein Gemisch aus einem defekten Virus und dem replikationskompetenten Heterovirus. Die einzige Ausnahme bildet hier das Rous Sarkom Virus (Teich, 1984a).

Es muß deshalb sowohl bei RFB MuLV als auch bei OS-5 MuLV ein anderer Pathogenesemechanismus zugrunde liegen als bei den Onkogen tragenden Viren.

Die Analysen des Genoms von RFB MuLV weisen einige Veränderungen auf, die sich im Bereich des env-Genes zu konzentrieren scheinen. Das Oligonukleotid Nr. 9 fehlt in der Fingerprintanalyse. Dieses Ergebnis wird evident durch das gleichzeitige Fehlen einer Kpn I - Schnittstelle, welche im env-Gen lokalisiert ist. Die exakte Position der Kpn I - Schnittstelle im Akv-Genom ist 6846, das Oligonukleotid Nr. 9 umfaßt die Nukleotide 6844 - 6866. Durch Mutationen in dieser Region geht also die Kpn I - Erkennungsstelle verloren, gleichzeitig verschwindet damit das Oligonukleotid Nr. 9.

Bei den Oligonukleotiden Nr. 45 A/B bzw. 23 A/B ist es durch das Zusammentreffen zweier Oligonukleotide nicht möglich zu beantworten, welches von beiden fehlt. Nur eine Sequenzanalyse des Oligonukleotids könnte darüber eindeutig Auskunft geben. Man kann aber davon ausgehen, daß Veränderungen im Polymerasegen (45 A) sehr selten vorkommen, da dieses Gen während der Evolution hochkonserviert wurde. Ähnliches gilt für das gag-Gen, das typisch ist für die Gruppenspezifität und sich innerhalb dieser nahe verwandten Gruppe ebenfalls nicht verändern sollte (23 B). Auf Grund dieser Überlegungen ist anzunehmen, daß die Oligonukleotide 23 A und 45 B fehlen. Da sich diese in unmittelbarer Nähe zueinander und zu Nr. 9 befinden (Pos. 6844 - 6988 im Akv-Genom), ist es wahrscheinlich, daß sich in diesem Abschnitt des env-Genes ein "Hot-spot" von Mutationen befindet.

Dieser Bereich des env-Genes kodiert für das gp70, ein Glykoprotein, welches für die Bindung des Virus am Zellrezeptor verantwortlich ist (Weiss, 1984). Die Veränderungen könnten damit von Bedeutung sein für die Onkogenität und die Gewebespezifität von RFB MuLV. Untersuchungen an MCF-Typen und am Spleen Focus Forming Virus bestätigen die Bedeutung des gp70 Proteins für die Gewebespezifität und das pathogene Potential von Leukämieviren (Holland, 1985a + b; Wolff, 1986).

Interessant ist bei OS-5 MuLV das Fehlen von Oligonukleotid Nr. 34. Dieses Oligonukleotid ist am 3'-Ende der U3-Region der LTR lokalisiert und hat im Genom von Akv MuLV die Sequenz AACCCCACACUCG (Pedersen, 1980). Durch die Transition von C nach T in Position 372 im OS-5 MuLV LTR (Nukleotid 4 des Oligonukleotids Nr. 34) ändert sich die Basenzusammensetzung dieses Oligonukleotides. Da die Auftrennung der einzelnen Oligonukleotide sowohl nach ihrer Größe als auch entsprechend ihrer Nukleotidkomposition erfolgt, muß dieses Signal verschwinden. Das neue Oligonukleotid konnte nicht identifiziert werden, da es in die oberen, nicht gut auflösenden Bereiche des Feldes wandert. Hinweise auf Veränderungen im env-Gen wurden bei OS-5 MuLV nicht beobachtet.

Die Zellspezifität von Retroviren wird neben dem env-Gen noch durch die LTR-Elemente mitbestimmt. Bei murinen Leukämieviren, die Krankheiten des lymphoproliferativen Systems induzieren, wurden die Determinanten für die Gewebespezifität und die Leukämogenität in den LTR-Sequenzen lokalisiert. Die Analyse der LTRs von OS-5 und RFB MuLV sollte durch den Vergleich der Nukleotidsequenzen ermöglichen, spezifische Merkmale für das jeweilige Isolat und dessen pathogene Eigenschaften zu finden. Außerdem bietet die Sequenzierung eine ausgezeichnete Basis für die Planung weitergehender Untersuchungen wie zum Beispiel Rekombinationsexperimente zwischen stark und schwach onkogenen Viren, welche dann detailliertere Aussagen über die Bedeutung der LTR-Strukturen liefern können.

Die LTR-Elemente von Retroviren enthalten zwei wichtige, cis-aktive Funktionen. Sie sind entscheidend für die Transposition und damit für die Rolle der Viren als Retroposon; zum anderen enthalten sie wichtige Kontroll- und Regulationssequenzen für die Transkription und

Translation der viralen Information (Temin, 1981). Die Sequenzanalyse der RFB- und OS-5 MuLV LTRs bestätigte das Vorhandensein von Konsensussequenzen für diese Funktionen. In der U3-Region befinden sich die typischen Signalsequenzen für eukaryontische Promotoren (Serfling, 1985). -30 Nukleotide von der CAP-Stelle ist die TATA-Box (Goldberg-Hogness-Box), der Bindungsort für die RNA-Polymerase lokalisiert und in Position -80 die CCAAT-Box. Diese Regionen sind bei eukaryontischen Genen hoch-konserviert.

"Upstream" von den Promotorelementen befinden sich bei murinen Leukämieviren häufig repetitiv angeordnete Sequenzen, die charakteristisch sind für Regionen mit Enhancerfunktion (Khoury, 1983; Serfling, 1985;). Die U3-Region von Akv MuLV enthält z. B. zwei Kopien der Sequenzen A - D in Tandemanordnung. In den LTRs der osteotropen Retroviren RFB-, OA- und OS-5 MuLV ergaben sich charakteristische Umlagerungen einzelner Sequenzabschnitte. Verdeutlicht werden diese Rearrangements durch ihre Darstellung als Segmentstrukturen (Abb. 21). In der U3-Region des OS-5 MuLV ist eine Einheit von A - D vollständig deletiert, die Segmente entsprechen jedoch in ihrer Anordnung der von Akv MuLV. RFB- und OA MuLV zeigen sowohl Deletionen als auch Rearrangements bestimmter Elemente.

Die Organisation der Segmente ist typisch und unverwechselbar für jedes Isolat. Ähnliche Rearrangements wurden beobachtet für T-Zell-lymotrope Viren (Lenz, 1984; Celander, 1984; Rosen, 1985). In diesen Studien wurde die Bedeutung der Veränderungen im Enhancer für die gewebespezifische Virusexpression demonstriert. Auf Grund dieser Ergebnisse kann eine Signifikanz der U3-Strukturen für die Gewebespezifität und Pathogenität osteotroper Retroviren angenommen werden.

Die Segmente B und D von RFB- und OA MuLV enthalten im Vergleich zu Akv- und OS-5 MuLV Punktmutationen. So ist in Element D im Nukleotid Nr. 14 eine Transition von C nach T und bei OA MuLV in der ersten Kopie von D ein weiterer Basenaustausch im Nukleotid 12 erkennbar. Bei RFB MuLV ist zusätzlich noch in Element B eine Transition von C nach T in Position 19 zu beobachten. Diese Punktmutationen verdeutlichen die Entstehung der Segmentstruktur. Ein einzelnes Element wird dupliziert und in neuer Anordnung in der Repeatregion rekombiniert. Die Entstehung der beschriebenen Punktmutationen nach dem Rearrangement an exakt der gleichen Position ist dagegen außerordentlich unwahrscheinlich.

Eukaryontische und virale Enhancerelemente enthalten ein komplexes Muster von Proteinbindungsstellen, die von Bedeutung sind für die positive Regulation der Transkription (Sen, 1986; Maniatis, 1987). Typischerweise sind diese Bindungsstellen in mehreren Kopien vorhanden und bei Eukaryonten und animalen Viren hochkonserviert (Zenke, 1986; Serfling, 1985). Auf Grund von Konsensussequenzen können einzelnen Elementen der U3-Region spezifische Bindungsfunktionen zugeordnet werden. So enthalten die Segmente A und B die Core-Sequenz GTGGAAAG, die eine Schlüsselrolle bei der Aktivität von Enhancern spielt (Weiher, 1983). Segment D enthält eine Akzeptor-Sequenz für Glucocorticoidhormon-Rezeptoren, GCAGAACAGATG (Karin, 1984).

Durch S1-Nuklease-Kartierung, Methylierungsinterferenz - Experimente und verwandte Methoden konnte die Bindung von Proteinen an die einzelnen Sequenzen nachgewiesen werden (McKnight, 1986; Sassone-Corsi, 1986; Maniatis, 1987). Einige der DNA bindenden Proteine wurden außerdem über DNA-Affinitätschromatographie isoliert und gereinigt (Jones, 1987; Briggs, 1986).

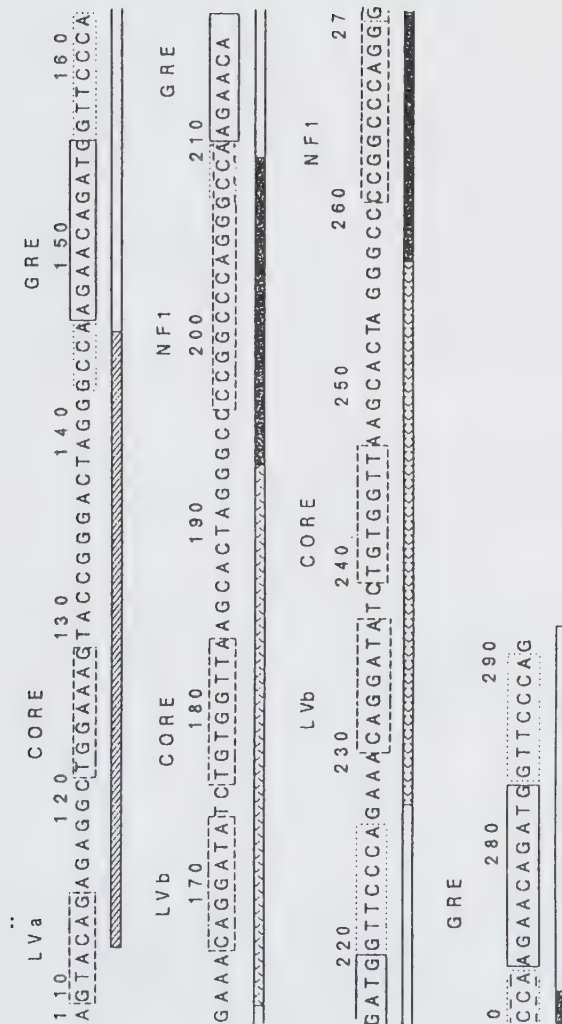


Abb. 33 Potentielle Bindungsstellen DNA-bindender Proteine im RFB-Enhancer (adaptiert nach Speck, 1987).

Die Segmente entsprechen der Darstellung in Abb. 21.

Durchgezogene und gestrichelte Linien entsprechen den minimalen Bindungsstellen (LVa; LVb) bzw. Konsensussequenzen (CORE; GRE; NF1) für Proteinfaktoren. Die gepunktete Linie um GRE zeigt die Grenzen für den DNase I Footprint mit einem gereinigten Glucocorticoid Rezeptor.

Abb. 33 zeigt ein hypothetisches Muster von verschiedenen Proteinen, die an Sequenzen in den Repeatstrukturen der RFB LTR binden könnten. Als Basis für diese Aufstellung dienten vor allem die Untersuchungen von Speck (1987), die nachweisen, daß mindestens sechs verschiedene Proteinfaktoren an den Enhancer von Moloney MuLV binden können.

Zusätzlich zu den beschriebenen Proteinen, die die Enhancer- und Steroidhormonrezeptor - Bindungsstellen erkennen, könnte noch das NF-1 - Protein an die Sequenz CGGCTCAGGGCCA binden. NF-1, ursprünglich als Stimulator der Adenovirus-Replikation beschrieben (Nagata, 1982), scheint ebenfalls eine Bindungsaffinität zu einer Reihe anderer Gene wie dem Hühner-Lysozym Gen oder der MMTV - LTR zu besitzen (Dylan, 1985). NF-1 ist wahrscheinlich identisch zu CTF, dem CCAAT-Transkriptionsfaktor (Jones, 1987).

LVB, mit der Erkennungssequenz CAGGATA, könnte in Segment B 5' vom Enhancer-Core binden, während LVA mit der Erkennungssequenz GTACAG in Segment A binden könnte.

Da Akv-, OA-, RFB- und OS-5 MuLV spezifisch Erkrankungen des lymphatischen Systems induzieren, ist eine weitere potentielle Bindungsstelle eines Proteins interessant, welches spezifisch in B-Zellen vorkommt. Es wurde sowohl im Immunglobulin κ -Enhancer als auch in SV 40 identifiziert (Sen, 1986), bindet an die Sequenz GGGGACTTTC und ist in den 5' und 3' LTRs osteotroper Retroviren in den invertierten Sequenzen lokalisiert.

Vergleicht man die Anordnung der Elemente A - E bei den vier Virusisolaten, so fällt auf, daß bei den Rearrangements die Grenzen der einzelnen Segmente präzise eingehalten werden. So konnte in keinem Fall die Insertion eines Segmentes in ein anderes beobachtet werden.

Eine Erklärung für dieses Phänomen könnte in dem Druck liegen, daß Bindungsstellen für Regulationsproteine im Laufe der Evolution konserviert werden müssen. Eine beliebige Anordnung der Elemente würde diese Proteinbindungsstellen zerstören und eine geordnete Steuerung der Virus-expression verhindern.

Die Bindung dieser Proteine ist keineswegs isoliert zu betrachten. Entscheidend für ihre optimale Aktivität ist die Interaktion benachbarter Elemente (Jantzen, 1987). Die bevorzugte Nachbarschaft einzelner Elemente wie z. B. C mit D findet in der überlappenden Bindung von Proteinen wie den Steroidrezeptoren oder NF1 eine Erklärung. Die Segmente A - E könnten also entsprechend einer optimalen Aktivität von Bindungsstellen rearrangiert und in der Evolution der osteotropen Retroviren konserviert worden sein.

Die Darstellung der potentiellen Proteinbindungsstellen im RFB-Enhancer zeigt die Komplexität der Organisation dieser Region. Nicht alle Proteine werden in jeder Zelle und zur gleichen Zeit exprimiert werden. Durch die differentielle Bindung an die Regulationssequenzen kann damit die Zelle zeitlich und zellspezifisch die Expression von Genen kontrollieren (Echols, 1986; Ptashne, 1986). Die Übernahme der Bindungsstellen durch das Virus ermöglicht wahrscheinlich eine zellspezifische Interaktion, welche zur Induktion onkogener Veränderungen führt.

Die große Variabilität in der Anordnung von Proteinbindungsstellen innerhalb eines Enhancers wurde hier am Beispiel der LTR von RFB MuLV evident. Ein Einfluß der Enhancerstruktur auf die biologische Aktivität von RFB-, OA-, Akv- und OS-5 MuLV ist sehr wahrscheinlich.

OS-5 MuLV besitzt mit einer einzelnen Kopie der Segmente A - D die geringste biologische Aktivität (Tab. 2).

Parallel zur Duplizierung dieser Region bei Akv MuLV ergibt sich eine Zunahme der Osteopetroserate und eine Verringerung der Lymphomlatenzzeit. Eine vermehrte Zahl an Proteinbindungsstellen und eine daraus resultierende verstärkte Expression könnte für die erhöhte Virulenz von Akv MuLV verantwortlich sein. Die verschiedenen Rearrangements und Punktmutationen im U3-Bereich könnten mit der Ausprägung der signifikanten biologischen Unterschiede bei RFB- und OA MuLV im Vergleich zu OS-5 MuLV in Zusammenhang stehen.

Die Beteiligung weiterer viraler Elemente an der Pathogenität und Pathospezifität ist natürlich nicht auszuschließen. So führt beim Spleen Focus Forming Virus (SFFV) der Austausch der LTR-Region mit der von Mo-MuLV zu keiner Änderung des pathogenetischen Potentials (Erythroleukämien), sondern hier wird die Beteiligung des env-Gens an der Gewebespezifität vermutet (Wolff, 1986). So haben wahrscheinlich die Veränderungen im env-Gen von RFB MuLV ebenso Anteil an dessen onkogener Wirkung wie die Enhancerelemente der U3-Region. Einen endgültigen Aufschluß über die Bedeutung der LTRs und der env-Region für die Pathogenese können nur Rekombinationsexperimente zwischen dem RFB MuLV - Genom und dem der anderen osteotropen Retroviren liefern.

Die hier vermutete Bedeutung der Enhancerstruktur für das onkogene Potential und die zellspezifische Wirkung von OA-, RFB-, Akv- und OS-5 MuLV sollte sich in der Transkriptionsaktivität und der Genexpression widerspiegeln. Mit Hilfe des CAT-Assays wurde versucht, die Aktivität der unterschiedlichen Enhancerbereiche von RFB-, OA-, Akv- und OS-5 MuLV miteinander zu vergleichen, um eine eventuelle Korrelation mit ihrer biologischen Wirkung zu erreichen.

Da bei einigen Promotoren ebenfalls eine zellspezifische Regulation diskutiert wird (Weyer, 1985; Picard, 1985;), wurde der Einfluß der gesamten U3-Kontrollregion auf die virale Transkription untersucht.

Die Rearrangements im Enhancerbereich stellen ein physiologisches System zur Untersuchung der Transkriptionsaktivität in Abhängigkeit von der Struktur der Repeatregion. Sie sind damit vergleichbar den Analysen, die auf in vitro erzeugten Deletions- und Insertionsmutanten basieren.

Die CAT-Aktivität in Abhängigkeit von den Akv-Regulationssequenzen war in NIH 3T3 - Zellen um das Dreifache höher als im Vergleich zu OS-5. Dieses Ergebnis ist mit dem Aufbau der Repeatstruktur gut erklärbar. Während sich der Akv-Enhancer aus einem Tandemrepeat zusammensetzt, ist im OS-5-Enhancer nur eine Kopie dieses Repeats vorhanden. Diese Korrelation der Aktivität mit der Zahl an Repeat-elementen ist auch bei in vitro erzeugten Deletionsmutanten der Mo MuSV-LTR beschrieben worden (Laimins, 1984). RFB und OA repräsentieren Strukturen, die zwischen den beiden Extremen OS-5 und AKV liegen. Die CAT-Aktivität von OA nähert sich der von OS-5 an, die von RFB liegt um den Faktor zwei höher als OS-5.

RFB-, OA-, Akv- und OS-5 MuLV enthalten in der Repeatregion eine unterschiedliche Zahl an Glucocorticoid-responsiven Elementen (GREs). So ist in der OS-5 LTR diese potentielle Glucocorticoid-Bindungsstelle in einer, in der OA- und Akv LTR in zwei und in der RFB LTR in drei Kopien repräsentiert. Diese Sequenzen gehören zusammen mit Metall-responsiven- und heat shock - Elementen zu einer Gruppe von Kontrollelementen der Transkription, welche durch externe Signale wie Hormone, Schwermetalle oder Temperaturänderungen induzierbar sind (Maniatis, 1987).

Nach Transfektion in Rezeptor-positive NIH 3T3 - Zellen konnte durch Zugabe von Steroidhormon die Transkription des Markergens CAT gesteigert werden. Die Steigerung lag mit dem 1.2 - 2 fachen weit unter den erwarteten Werten. Ein Grund für die geringe Induktion in NIH 3T3 Zellen könnte in der hohen Basisexpression von CAT1 OS-5 (23 %) zu suchen sein. In solchen Fällen ist nur ein geringer Anstieg der Expressionsrate zu beobachten (Celandier, in Vorb.).

Die gleichen Versuche wurden in der ROS 17/2.8 - Zelllinie wiederholt, welche in Kultur zu Osteoblasten-ähnlichen Zellen differenziert. Sie zeigt eine geringere Konversionsrate von nur 5 % nach CAT1 OS-5 - Transfektion, und hier wurde nach Dexamethasoninduktion eine Steigerung um das Zwei- bis Dreifache beobachtet.

Eine direkte Korrelation der Zahl an GREs mit der Höhe der Expression konnte nicht festgestellt werden. Ein solches additives Verhalten der Aktivität mit steigender Zahl an GREs wurde von Toohey (1986) beschrieben. Für die Ausprägung des Hormoneffektes ist jedoch vor allem auch der Kontext des GRE entscheidend. So ist die LTR von Mo MSV durch Steroidhormonzugabe induzierbar, die Mo MuLV-LTR mit der identischen Akzeptorstelle jedoch ist nicht beeinflussbar. (Miksicek, 1986,; Overhauser, 1985).

Die Expression von Genen unter Kontrolle viraler Enhancer aus OA-, RFB-, Akv- und OS-5 MuLV ist durch Steroidhormone regulierbar. In Zellen mit Glucocorticoid-Rezeptoren kann somit die Aktivität von Genen durch externe Signale gesteuert werden. Die Antwort auf die Induktion ist nicht abhängig von der Zahl der GREs, sondern von ihrer Position in der U3-Region. Die physiologische Bedeutung dieser Regulation für das Virus und die Virus-Zell-Interaktion sind noch nicht bekannt.

Die Zell- und Gewebespezifität muriner Leukämieviren ist häufig in den Enhancerstrukturen determiniert (Rosen, 1985; Lenz, 1984; Chatis, 1983, 1984; Celander, 1984). Da OA-, RFB-, Akv- und OS-5 MuLV Tumoren im Knochengewebe induzieren, war es von Interesse, den Zusammenhang zwischen den viralen Regulationssequenzen und der Expression in differenzierten und undifferenzierten Zellen zu analysieren.

Die ersten, wenn auch noch vorläufigen Ergebnisse zeigten eine erhöhte Aktivität der Enhancersequenzen von OA-, RFB- und OS-5 MuLV in ROS 17/2.8 - Zellen, die durch spezifische Marker wie Alkalische Phosphatase als differenzierte Osteoblastenzellen charakterisiert sind. In den undifferenzierten ROS 25/1 - Zellen lag die Aktivität, gemessen an der Expression des Indikatorenzym CAT, um das 2.5 - 3 fache niedriger. Diese Ergebnisse lassen erwarten, daß OS-5-, OA- und RFB-Enhancer eine präferentielle Aktivität in Knochenzellen zeigen. Dies würde gleichzeitig eine Erklärung für die Induktion knochenspezifischer Veränderungen durch osteotrope Retroviren aufzeigen.

E: Z u s a m m e n f a s s u n g

Die biologische Aktivität der murinen, osteotropen Leukämieviren OS-5, RFB, Akv und OA ergab signifikante Unterschiede in der Häufigkeit, mit der Knochenveränderungen induziert werden und in der Latenzzeit bis zur Manifestation der Erkrankung. Der Vergleich der Genomstruktur von Akv- und OA MuLV mit den noch nicht charakterisierten Isolaten RFB- und OS-5 MuLV sollte ermöglichen, die für das onkogene Potential der Viren verantwortlichen Genomabschnitte zu lokalisieren.

- RFB- und OS-5 MuLV sind ecotrope Retroviren mit einem kompletten, replikationsfähigen Genom. Sie enthalten keine erkennbaren Deletionen oder Insertionen und tragen kein Onkogen. Das Genom beider Isolate zeigt eine hohe Homologie zu Akv- und OA MuLV auf Basis der Fingerprintanalyse und Restriktionsenzymkartierung und unterstreicht damit die nahe Verwandtschaft dieser Retroviren. RFB MuLV enthält im gp70 - Gen der env-Region eine Häufung von Veränderungen, die für die Pathogenität des Virus von Bedeutung sein könnten. OS-5 MuLV dagegen zeigte keine Anhaltspunkte für solche Mutationen.

- Die Sequenzanalyse der RFB- und OS-5 - LTRs zeigte Rearrangements und Punktmutationen einzelner Segmente im Enhancerbereich der U3-Region. Die Relevanz dieser Region für die Zellspezifität und Pathogenität bei anderen murinen Leukämieviren ist bekannt. Die beobachteten Veränderungen sind spezifisch für jedes Isolat und könnten in engem Zusammenhang mit dem onkogenen Potential osteotroper Retroviren stehen.

- Die Enhancerregion enthält Sequenzen für eine Vielzahl DNA bindender Proteine. Durch die Kombination einzelner Bindungsstellen und die Interaktion der Bindungsproteine ist die Zelle in der Lage, die Transkription und die Expression von Proteinen während Differenzierungsvorgängen zu steuern. Die Übernahme der Bindungsstellen durch das Virus ermöglicht wahrscheinlich eine zellspezifische Interaktion, welche zur Induktion onkogener Veränderungen führt.

- Die Transkriptionsaktivität osteotroper Retroviren ist abhängig vom Aufbau der Enhancerregion. Die Expression kann extern durch Glucocorticoid-Hormone reguliert werden und scheint vom Differenzierungsstatus der Zelle abhängig zu sein.

- Noch vorläufige Ergebnisse zeigen eine erhöhte Aktivität der Enhancer von OA-, RFB- und OS-5 MuLV in sich differenzierenden Knochenzellen. Diese Spezifität der Transkription könnte die knochenspezifische Pathogenität osteotroper, replikationskompetenter Retroviren erklären.

F: L I T E R A T U R

Birnboim, C., Doly, J.: Rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucl. Acids Res. 7, 1513 - 1523, (1979).

Briggs, M. R., Kadonaga, J. T., Bell, S. P., Tijan, R.: Purification of the promoter-specific transcription factor, Spl. Science, 234, 47 - 52 (1986).

Celander, D., Haseltine, W. A.: Glucocorticoid regulation of murine leukemia virus transcription elements is specified by determinants within the viral enhancer region. (in Vorb.).

Celander, D., Haseltine, W. A.: Tissue-specific transcription preference as a determinant of cell tropism and leukemogenic potential of murine retroviruses. Nature 312, 159 - 162 (1984).

Chatis, P. A., Holland, C. A., Hartley, J. W., Rowe, W. P., Hopkins, N.: Role for the 3' end of the genome in determining disease specificity of Friend and Moloney murine leukemia viruses. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 4408 - 4411 (1983).

Chatis, P. A., Holland, C. A., Silver, J. E., Frederickson, T. N., P., Hopkins, N., Hartley, J. W.: A 3' end fragment encompassing the transcriptional enhancers of nondefective Friend virus confers erythroleukemogenicity on Moloney leukemia virus. J. Virol. 52, 248 - 254 (1984).

- Chattopadhyay, S. K., Lander, M. R., Rands, E., Lowy, D. R.: Structure of endogenous murine leukemia virus DNA in mouse genomes.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 5774 - 5778 (1980).
- Chattopadhyay, S. K., Cloyd, M. W., Linemeyer, D. L., Lander, M. R., Rands, E., Lowy, D. R.: Cellular origin and role of mink cell focus forming viruses in murine thymic lymphomas. Nature 295, 25 - 31 (1982).
- Chen, T. R.: In situ detection of mycoplasma contamination in cell cultures by Hoechst 33258 stain.
Exp. Cell Res. 104, 255 - 262 (1977).
- Coffin, J.: Endogenous Viruses. In: RNA Tumor Viruses (Weiss, R., Teich, N., Varmus, H., Coffin, J., Eds.), 1109 - 1203, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1984).
- Curran, T., Peters, G., van Beveren, C., Teich, N., Verma, I. M.: FBJ murine osteosarcoma virus: Identification and molecular cloning of biologically active proviral DNA. J. Virol. 44, 674 - 682 (1982).
- DesGroseillers, L., Jolicoeur, P.: Physical mapping of the Fv-1 tropism host range determinant of Balb/c murine leukemia viruses. J. Virol. 48, 685 - 696 (1983).
- DesGroseillers, L., Jolicoeur, P.: Mapping the viral sequences conferring leukemogenicity and disease specificity in Moloney and amphotropic murine leukemia viruses. J. Virol. 52, 448 - 456 (1984a).

- Des Groseillers, L., Jolicoeur, P.: The tandem direct repeats within the long terminal repeat of murine leukemia viruses are the primary determinant of their leukemogenic potential. *J. Virol.* 52, 945 - 952 (1984b).
- Dynan, W. S.: A single protein that binds to enhancers, promoters and replication origins?
Trends Genet. 1, 269 - 270 (1985).
- Echols, H.: Multiple DNA-Protein interactions governing high-precision DNA transactions.
Science 233, 1050 - 1056 (1986).
- Erfle, V., Hehlmann, R., Schetters, H., Meier, A., Luz, A.: Time course of C-type retrovirus expression in mice submitted to osteosarcomagenic doses of $^{224}\text{Radium}$.
Int. J. Cancer 26, 107 - 113 (1980).
- Erfle, V., Schmidt, J., Strauss, G. P., Hehlmann, R., Luz, A.: Activation and biological properties of endogenous retroviruses in radiation osteosarcomagenesis. *Leuk. Res.* 10, 905 - 913 (1986).
- Etzerodt, M., Mikkelsen, T., Pedersen, F. S., Kjeldgaard, N. O., Jørgensen, P.: The nucleotide sequence of the Akv murine leukemia virus genome.
Virology 134, 196 - 207 (1984).
- Evans, L. H., Cloyd, M. W.: Friend and moloney murine viruses specifically recombine with different endogenous retroviral sequences to generate mink cell focus-forming viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 495 - 463 (1985).

- Finkel, M. P., Biskis, B. O., Jenkins, P. B.: Virus induction of osteosarcomas in mice. Science 151, 698 - 701 (1966).
- Finkel, M. P., Reilly, C. A. , Biskis, B. O., Greco, J. L.: Bone tumor viruses. In: Bone - Certain aspects of neoplasia. Colston Papers No. 24 (Price, C. H. G., Ross, F. G. M. eds.), Butterworth, London. (1973)
- Finkel, M. P., Reilly, C. A. Jr., Biskis, B. O.: Viral etiology of bone cancer. Front. Radiat. Ther. Oncol. 10, 28 - 39 (1975).
- Gorman, C. M., Moffat, L. F., Howard, B. H.: Recombinant genomes which express Chloramphenicol Acetyltransferase in mammalian cells. Mol. Cell. Biol. 2, 1044 - 1051 (1982).
- Heinrich, P.: Guidelines for quick and simple plasmid sequencing. Fa. Boehringer, Mannheim (1986).
- Henikoff, S.: Unidirectional digestion with exonuclease III creates targeted breakpoints for DNA sequencing. Gene 28, 351 - 359 (1984).
- Herr, W.: Nucleotide sequence of Akv murine leukemia virus. J. Virol. 49, 471 - 478 (1984).
- Holland, C. A., Wozney, J., Chatis, P. A., Hopkins, N., Hartley, J. W.: Construction of recombinants between molecular clones of murine retrovirus MCF 247 and Akv: Determinant of an in vitro host range property that maps in the long terminal repeat. J. Virol. 53, 152 - 157 (1985a).

- Holland, C. A., Hartley, J. W., Rowe, W. P., Hopkins, N.:
At least four viral genes contribute to the
leukemogenicity of murine retrovirus MCF 247 in AKR
mice. *J. Virol.* 53, 158 - 165 (1985b).
- Horowitz, J. M., Risser, R.: Molecular and biological
characterization of the endogenous ecotropic provirus
of the Balb/c mice. *J Virol.* 56, 798 - 806 (1985).
- Jaenisch, R. Endogenous retroviruses: *Cell* 32, 5 - 6
(1983).
- Jantzen, H.-M., Srähle, U., Gloss, B., Stewart, F.,
Schmid, W., Boshart, M., Miksicek, R., Schütz, G.:
Cooperativity of glucocorticoid responsive elements
located far upstream of the tyrosine aminotransferase
gene. *Cell* 49, 9 - 38 (1987)
- Jones, K. A., Kadonaga, J. T., Rosenfeld, P. J., Kelly, T.
J., Tijan, R.: A cellular DNA-binding Protein that
activates eucaryotic transcription and DNA replication.
Cell 48, 79 - 89 (1987).
- Karin, M., Haslinger, A., Holtgreve, H., Richards, R. I.,
Krauter, P., Westphal, H. M., Beato, M.:
Characterization of DNA sequences through which cadmium
and glucocorticoid hormone induce human
metallothionein-IIA gene. *Nature* 308, 513 - 519 (1984).
- Khoury, G., Gruss, P.: Enhancer elements. *Cell* 33, 313 -
314 (1983).
- Laimins, L. A., Gruss, P., Pozzatti, R., Khoury, G.:
Characterization of enhancer elements in the long
terminal repeat of Moloney murine sarcoma virus.
J. Virol. 49, 183 - 189 (1984).

- Laimins, L. A., Khoury, G., Gorman, C., Howard, B., Gruss, P.: Host-specific activation of transcription by tandem repeats from simian virus 40 and Moloney murine sarcoma virus.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 6453 - 6457 (1982).
- Leib-Mösch, C., Schmidt, J., Etzerodt, M., Pedersen, F. S., Hehlmann, R., Erfle, V.: Oncogenic retrovirus from spontaneous murine osteomas. II. Molecular cloning and genome characterization. Virology 150, 96 - 105 (1986).
- Lenz, J., Celander, D., Crowther, R. L., Patarca, R., Perkins, D. W., Haseltine, W. A.: Determination of the leukaemogenicity of a murine retrovirus by sequences within the long terminal repeat.
Nature 308, 467 - 470 (1984).
- Li, Y., Golemis, E., Hartley, J. W., Hopkins, N.: Disease specificity of nondefective Friend and Moloney murine leukemia viruses is controlled by a small number of nucleotides. J. Virol. 61, 693 - 700 (1987).
- Lipp, M., Schilling, R., Wiest, S., Laux, G., Bornkamm, G. W.: Target sequences for cis-acting regulation within the dual promoter of the human c-myc gene.
Mol. Cell. Biol. 7, 1393 - 1400 (1987).
- Maniatis, T., Fritsch, E. F., Sambrook, J.: Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor laboratory. Cold Spring harbor, New York (1982).
- Maniatis, T., Goodbourn, S., Fischer, J. A. Regulation of inducible and tissue-specific gene expression. Science 236, 1237 - 1245 (1987).

- Majeska, R. J., Rodan, S. B., Rodan, G. A.: Parathyroid hormone-responsive clonal cell lines from rat osteosarcoma. *Endocrinology* 107, 1494 - 1503 (1980).
- McKnight, S., Tijan, R., Transcriptional selectivity of viral genes in mammalian cells.
Cell 46, 795 - 805 (1986).
- Messing, J., Crea, R., Seeburg, P. H.: A system for shotgun DNA sequencing.
Nucl. Acids Res. 9, 309 - 321 (1981).
- Miksicek, R., Heber, A., Schmid, W., Danesch, U., Posseckert, G., Beato, M., Schütz, G.: Glucocorticoid responsiveness of the transcriptional enhancer of Moloney murine sarcoma virus. *Cell* 46, 283 - 290 (1986).
- Morrison, D. A.: Transformation and preservation of competent bacterial cells by freezing.
Meth. Enzymol. 68, 326 - 331 (1979).
- Murray, A. B., Schmidt, J., Rieke, L.: Retrovirus-induced osteopetrosis in mice: Ultrastructural identification of the target cell. (in Vorb.)
- Nagata, K., Guggenheimer, R. A., Inomoto, T., Lichy, J. H., Hurwitz, J.: Adenovirus replication in vitro: identification of a host factor that stimulates synthesis of the preterminal protein-dCMP complex.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 6438 - 6442 (1982).
- Nexø, B. A.: A plaque assay for murine leukemia virus using enzyme coupled antibodies.
J. Virol. 77, 849 - 852 (1977).

Ou, C.-Y., Boone, L. R., Koh, C.-K., Tennant, R. W., Yang, W. K.: Nucleotide sequences of gag-pol regions that determine the Fv-1 host range property of Balb/c N-tropic and B-tropic murine leukemia viruses. J. Virol. 48, 779 - 784 (1983).

Overhauser, J., Fan, H.: Generation of glucocorticoid-responsive Moloney murine leukemia virus by insertion of regulatory sequences from murine mammary tumor virus into the long terminal repeat. J. Virol. 54, 133 - 144 (1985).

Payvar, F., DeFranco, D., Firestone, G. L., Edgar, B., Wrange, Ö., Okret, S., Gustaffson, J. A., Yamamoto, K. R.: Sequence-specific binding of glucocorticoid receptor to MMTV DNA at sites within and upstream of the transcribed region. Cell 35, 381 - 392 (1983).

Pedersen, F. S., Haseltine, W.: Analysis of the genome of an endogenous, ecotropic retrovirus of the AKR strain of mice: Micromethod for detailed characterization of high-molecular-weight RNA. J. Virol. 33, 349 - 365 (1980).

Pedersen, F. S., Etzerodt, M.: Structure of endogenous retroviruses expressed in radiation-induced and spontaneous murine bone tumours. Leuk. Res. 10, 923 - 930 (1986).

Pedersen, F. S., Etzerodt, M., Lovmand, S., Dai, H. Y., Baekgaard, A. J., Sørensen, J., Jørgensen, P., Kjeldgaard, N. O., Leib-Mösch, C., Luz, A., Erfle, V.: Transcriptional control and oncogenicity of murine leukemia viruses. In: Viral Carcinogenesis (Kjeldgaard, N. O., Forchhammer, J., Eds.), 17 - 29, Alfred Benzon Symposium 24, Munksgaard, Copenhagen, (1987).

- Picard, D., Schaffner, W.: Cell-type preference of immunoglobulin k and gene promoters. EMBO J. 4, 2831 - 2838 (1985).
- Poncz, M., Solowiejczyk, D., Ballantine, M., Schwartz, E., Surrey, S.: "Nonrandom" DNA sequence analysis in bacteriophage M13 by the dideoxy chain-termination method. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 4298 - 4302 (1982).
- Ptashne, M.: Gene regulation by proteins acting nearby and at a distance. Nature 322, 697 - 701 (1986).
- Risser, R., Horowitz, J. M.: Endogenous mouse leukemia viruses. Ann. Rev. Genet. 17, 85 - 121 (1983).
- Rodan, G. A., Rodan, S. B.: Expression of the osteoblastic phenotype. In: Bone and Mineral Research, Ann. 2, (Peck, W. A. ed.) 244 - 285, Elsevier, Amsterdam (1984).
- Rommelaere, J., Donis-Keller, H., Hopkins, N.: RNA sequencing provides evidence for allelism of determinants of the N-, B- or NB-tropism of murine leukemia viruses. Cell 16, 43 - 50 (1979).
- Rosen, C. A., Haseltine, W. A., Lenz, J., Ruprecht, R., Cloyd, M. W.: Tissue selectivity of murine leukemia virus infection is determined by long terminal repeat sequences. J. Virol. 55, 862 - 866 (1985).
- Rowe, W. P.: Studies of genetic transmission of murine leukemia viurus by AKR mice. I. Crosses with Fv-1ⁿ strains of mice. J. Exp. Med. 136, 1272 - 1285 (1972),

- Rowe, W. P.: Genetic factors in the natural history of murine leukemia virus infection. Cancer Res. 33, 3061 - 3068 (1973).
- Rowe, W. P., Kozak, C. A.: Germline reinfections of AKR murine leukemia virus genomes in Akv-1 congenic mice. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4871 - 4874 (1980).
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R.: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463 - 5467 (1977).
- Sassone-Corsi, P., Borelli, E.: Transcriptional regulation by trans-acting factors. Trends Genet. 2, 215 - 219 (1986).
- Scheidereit, C., Geisse, S., Westphal, H. M., Beato, M.: The glucocorticoid receptor binds to defined nucleotide sequences near the promoter of mouse mammary tumor virus. Nature 304, 749 - 752 (1983).
- Schmidt, J., Erfle, V.: Elimination of mycoplasmas from cell cultures and establishment of mycoplasma-free cell lines. Exp. Cell Res. 152, 565 - 570 (1984).
- Schmidt, J., Erfle, V., Pedersen, F. S., Rohmer, H., Schetters, H., Marquart, K.-H., Luz, A.: Oncogenic retrovirus from spontaneous murine osteomas. I. Isolation and biological characterization. J. Gen. Virol. 65, 2237 - 2248 (1984).
- Schmidt, J., Erfle, V., Müller, W. A.: Activation of endogenous C-type retroviral genomes by internal alpha-irradiation of mice with ²²⁴Radium. Radiat. Environ. Biophys. 24, 17 - 15 (1985).

- Schmidt, J., Casser-Bette, M., Rodan, G. A.: Bone tumor-inducing retroviruses and osteoblastic cells in vitro: Target cell specificity and effects of viral infection (in. Vorb.)
- Sen, R., Baltimore, D.: Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. Cell 46, 705 - 716 (1986).
- Serfling, E., Jasin, M., Schaffner, W.: Enhancers and eukaryotic transcription. Trends Genet. 1, 224 - 230 (1985).
- Silver, J., Kozak, C.: Common proviral integration region on mouse chromosome 7 in lymphomas and myelogenous leukemias induced by Friend murine leukemia virus. J. Virol. 57, 526 - 533 (1986).
- Southern, E. M.: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98, 503 - 517 (1975).
- Speck, N. A., Baltimore, D.: Six distinct nuclear factors interact with the 75-base-pair repeat of the Moloney murine leukemia virus enhancer. Mol. Cell. Biol. 7, 1101 - 1110 (1987).
- Stoye, J., Coffin, J.: Endogenous viruses. In: RNA Tumor Viruses. (Weiss, R., Teich, N., Varmus, H., Coffin, F. eds.) Vol. 2, 357 - 404. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (1985).
- Strauss, P. G., Schmidt, J., Pedersen, L., Erfle, V.: Amplification of endogenous proviral MuLV sequences in radiation-induced osteosarcomas. Int. J. Cancer 41, (1988), im Druck.

Teich, N.: Taxonomy of retroviruses. In: RNA Tumor Viruses (Weiss, R, Teich, N., Varmus, H., Coffin, J., Eds.), 25 - 208, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1984a).

Teich, N. Wyke, J., Mak. T., Bernstein, A., Hardy, W.: Pathogenesis of retrovirus-induced disease. In: RNA Tumor Viruses (Weiss, R, Teich, N., Varmus, H., Coffin, J., Eds.), 785 - 998, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1984b).

Temin, H. M.: Structure, variation and synthesis of the retrovirus long terminal repeat. Cell 27, 1 - 3 (1981).

Toohey, M. G., Morley, K. L., Peterson, D. O.: Multiple hormone-inducible enhancers as mediators of differential transcription. Mol. Cell. Biol. 6, 4526 - 4538 (1986).

Tsichlis, P. N., Strauss, P. G., Hu, L. F.: A common region for proviral DNA integration in MoMuLV-induced rat thymic lymphomas. Nature 302, 445 - 449 (1983).

Varmus, H. E.: Form and function of retroviral proviruses. Nature 216, 812 - 820 (1982).

Varmus, H. E.: The molecular genetics of cellular oncogenes. Ann. Rev. Genet. 18, 553 - 612 (1984).

Vaughn, J. J.: The effects of irradiation on the skeleton. Clarendon Press, Oxford (1973).

Vieira, J., Messing, J.: The pUC plasmid, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. Gene 19, 259 - 268 (1982).

- Weiher, H., Zonig, M., Gruss, P.: Multiple point mutations affecting the simian virus 40 enhancer. Science 219, 626 - 631 (1983).
- Weintraub, H., Cheng, P. F., Conrad, K.: Expression of transfected DNA depends on DNA topology. Cell, 46, 115 - 122 (1986).
- Weiss, R.: The search for human RNA tumor viruses. In: RNA Tumor Viruses (Weiss, R, Teich, N., Varmus, H., Coffin, J., Eds.), 1205 - 1282, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1984a).
- Weyer U., Doerfler, W.: Species dependence of the major late promoter in adenovirus type 12 DNA. EMBO J. 4, 3015 - 3019 (1985).
- Wolff, L., Ruscetti, S.: Tissue tropism of a leukemogenic murine retrovirus is determined by sequences outside of the long terminal repeats. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 3376 - 3380 (1986).
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J., Messing, J.: Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mpl8 and pUC19 vectors. Gene 33, 103 - 119 (1985).
- Zenke, M., Grundström, T., Matthes, H., Wintzerith, M., Schatz, C., Wildeman, A., Chambon, P.: Multiple sequence motifs are involved in SV40 enhancer function. EMBO J. 5, 387 - 397 (1986).

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung für Molekulare Zellpathologie der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung, Neuherberg, angefertigt. Doktorvater war Herr Prof. Dr. H. Schmieger vom Institut für Genetik und Mikrobiologie der Universität München.

Ich danke Herrn Priv.-Doz. Dr. V. Erfle für seine Anregung zu dieser Arbeit und für die Bereitstellung der Arbeitsmöglichkeiten.

Herrn Priv.-Doz. Dr. A. Luz danke ich für die detaillierten Sektionsberichte zur Beurteilung der in vivo-Daten.

Die fortlaufende Betreuung der Arbeit durch Herrn Dr. G. Strauß soll hier besonders hervorgehoben werden. Die vielen Diskussionen und praktischen Hinweise, durch die er mich während der Anfertigung der Arbeit bereitwillig unterstützte sowie seine kritische Durchsicht der vorliegenden Arbeit waren für das Gelingen unentbehrlich.

Während meines Aufenthaltes am Institut für Molekularbiologie der Universität Aarhus, DK, war mir Dr. F. S. Pedersen, Dr. P. Jørgensen, Prof. Dr. N. O. Kjeldgaard sowie viele der Doktoranden, insbesondere H.-Y. Dai und S. Lovmand, unersetzliche Gesprächspartner.

Herrn N. Funk danke ich für die Mithilfe bei der Anfertigung der Computer-gestützten Zeichnungen.

Allen weiteren Mitgliedern der Abteilung für Molekulare Zellpathologie danke ich für ihre Unterstützung und für die ausgezeichnete Arbeitsatmosphäre.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, Gabi sowie meinen Freunden, deren Verständnis und Hilfe die Durchführung der Arbeit wesentlich erleichterte.

L e b e n s l a u f

Name:	Werner Behnisch
Geburtsdatum:	29. 6. 1955
Geburtsort:	Erding
Staatsangehörigkeit:	Deutsch
Familienstand:	ledig

Schulbildung

9. 62 - 8. 66	Grundschule in Erding
9. 66 - 6. 75	Gymnasium in Erding
6. 75	Abschluß mit Abitur
8. 75 - 10. 76	Zivildienst beim Bayr. Roten Kreuz, München

Studium

11. 76. - 8. 83	Biologiestudium an der Ludwig-Maximilians-Universität, München
3. 79	Diplomvorprüfung
10. 82	Diplomhauptprüfung: Genetik, Mikrobiologie, Biochemie
11. 82 - 7. 83	Diplomarbeit bei Prof. Dr. H. Schmieger, Inst. f. Genetik, LMU, München.
8. 83	Abgabe der Diplomarbeit
seit 10. 83	Promotionsstudium bei Prof. Dr. V. Erfle, Ges. f. Strahlen- und Umweltforschung, Neuherberg,
8. 85 - 11. 85	Forschungsaufenthalt an der Universität Aarhus, Dänemark

Zu diesem Buch:

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, zwei der osteotropen Retrovirus-isolate, OS-5 MuLV und RFB MuLV, in ihrer molekularen Organisation und Feinstruktur näher zu charakterisieren.

Der Vergleich der gewonnenen Daten mit denen von OA MuLV und Akv MuLV ergab Hinweise, welche Abschnitte des viralen Genoms für die spezifischen pathogenen Eigenschaften der einzelnen Isolate verantwortlich sind.

Zum Autor:

Werner Behnisch studierte Biologie in München und Aarhus, Dänemark. Die Forschungsarbeiten zur vorliegenden Veröffentlichung wurden in der Gesellschaft für Stahlen- und Umweltforschung, Prof. Dr. V. Erfle, Neuherberg, durchgeführt und von der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München als Promotionsschrift angenommen.